

GONÇALA MARIA MARTINS ARITA



Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida pela candidata Gonçala Maria
Martins Arita e aprovada pela Comissão Julga-
dora.

17/12/90

Virus da língua azul: estudo do antígeno viral, produzido a
partir do sorotipo 4, para fins de diagnóstico sorológico

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do grau de mestre.

CAMPINAS - SP

1990

Ar46v

13133/BC

GONÇALA MARIA MARTINS ARITA

Virus da língua azul: estudo do antígeno viral, produzido a partir do sorotipo 4, para fins de diagnóstico sorológico

BC/9100937
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Universidade Estadual de Campinas
São Paulo - Brasil

1990

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi executado no
Departamento de Microbiologia e
Imunologia do IB/UNICAMP e no
Laboratório Regional de Apoio Animal
LARA/Campinas - Ministério da
Agricultura e Reforma Agrária.

Dedico ao Hiromi, às nossas filhas, Harumi, Harue e Hanae, e a meus pais "*in memorian*", com carinho e gratidão pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldades e pela infinita paciência e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, orientador desta tese, pela confiança depositada, oportunidade e ajuda para torná-la realidade.

Ao Médico Veterinário, José Guedes Deak, Chefe do Laboratório Regional de Apoio Animal - LARA/Campinas - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, pela permissão, apoio, incentivo e confiança em mim depositada.

A Prof. Maria Silvia Viccari Gatti do Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB/UNICAMP, pelas sugestões apresentadas durante a execução prática e revisão do texto de grande parte deste trabalho, apoio e incentivo, assim como à Mirtes e Natalícia, do mesmo laboratório, pela ajuda na execução prática, e acima de tudo, pela convivência harmoniosa que tivemos durante todo este tempo.

A Médica Veterinária, Ivanete Kotait e à Bióloga, Dra. Maria Mércia Barradas, pesquisadoras científicas do Instituto Biológico de São Paulo, pela revisão e inúmeras sugestões apresentadas ao texto final, e acima de tudo, pela atenção, apoio e amizade.

Ao Dr. Michael Bedoya, representante do Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura no Brasil e ao Dr. Décio de Araújo Lira, então, Coordenador das atividades de Diagnóstico do LANARA, que possibilitaram o fornecimento do material biológico usado nesta tese.

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela avaliação estatística dos resultados sorológicos.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, ao Prof. Domingos da Silva Leite, ao Sr. Manoel, Marcina e Stelinha, do Laboratório de Antígenos Bacterianos, do Dep. de Micro-Imuno - IB/UNICAMP, pela ajuda nas purificações de imunoglobulinas realizadas no presente trabalho, incentivo e amizade.

Ao Dr. Helio Gelli Pereira e Dra. Monika O. Barth, pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz/RJ, pela orientação e acompanhamento no processo de purificação viral e estudo através de microscopia eletrônica.

Ao Dr. G. M. Brown, Dr. R. Ranger e Dr. J. E. Pearson, pelo treinamento na produção do antígeno solúvel e pelas inúmeras informações e material bibliográfico fornecidos.

Ao Prof. Dr. Marcos Garcia Costa, então Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Imunologia do IB/UNICAMP, à Prof. Dra. Marlene Braide Serafim e demais professores Deste departamento, pelo apoio, ajuda e permissão de uso de equipamentos nos diversos laboratórios.

Aos Médicos Veterinários, Albino Alonso, Magnus Sondhal e Rossana, do Setor de Sorologia do Centro Panamericano de Febre Aftosa (CPFA), pela ajuda, pela permissão de utilização da ultracentrífuga do laboratório e pela amabilidade e presteza de seus funcionários.

A Sra. Ana Gagliardi, Diretora Técnica da Biblioteca do IB/UNICAMP, pela revisão das referências bibliográficas, às funcionárias desta mesma biblioteca e aos Bibliotecários do CPFA, Sra. Astrid e Pinheiro, pelo apoio no fornecimento de diversas publicações.

A Prof. Dra. Massaio Ishizuka, da Faculdade de Veterinária da USP, pelo fornecimento do conjugado que foi usado como referência no início dos trabalhos com imunofluorescência.

Aos colegas Pinkoski, Julio, Berenice e Marcia do LARA/Campinas, pela agilização e solicitude em prover alguns materiais em momentos oportunos.

A Fátima, Mara, Amires, Jeronima, Ademir e Paulo Vitor, funcionários do Setor de Diagnóstico do LARA/Campinas, pelo valioso auxílio técnico.

Ao colega José Roberto e aos funcionários José Ferreira, José Paixão e Adilson, do Setor de Células e Meios do LARA/Campinas, pelo fornecimento das culturas celulares e algumas soluções.

Aos colegas de turma, pelo companheirismo que permitiu a superação dos momentos de dificuldade e pela participação nas reuniões de estudo.

As minhas irmãs Isabel e Auzairtes, que mesmo à distância, me deram um apoio significativo.

A todas as pessoas e/ou Instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

CONTEUDO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico.....	4
1.2 Agente etiológico.....	8
1.3 Características principais da doença.....	19
1.4 Resposta imune.....	22
1.5 Epidemiologia.....	25
1.6 Diagnóstico.....	27
2 MATERIAL E METODOS.....	37
2.1 Vírus.....	37
2.2 Linhagens celulares.....	37
2.2.1 Manutenção das culturas celulares.....	37
2.2.2 Preparação das garrafas de culturas celulares.....	38
2.2.2.1 Células BHK - 21, clone 13.....	38
2.2.2.2 Células VERO.....	38
2.2.3 Preparação das microplacas.....	39
2.2.4 Preparação das células em lamínulas.....	39
2.3 Meio de cultura.....	40
2.4 Inoculação viral.....	40
2.4.1 Titulação da semente viral.....	41
2.4.2 Inoculação das células preparadas em lamínulas.....	42
2.4.3 Preparação das suspensões virais.....	43
2.5 Purificação viral.....	44
2.5.1 Microscopia eletrônica (ME).....	46
2.5.1.1 Determinação do diâmetro das partículas virais.....	46
2.5.2 Análise do ARN.....	47
2.5.2.1 Extração do ARN.....	47
2.5.2.2 Preparação do gel.....	48
2.5.2.3 Coloração do gel.....	49

2.5.3	Análise das proteínas.....	49
2.5.3.1	Preparação das amostras.....	50
2.5.3.2	Montagem do gel.....	50
2.5.3.3	Coloração do gel.....	51
2.5.4	Determinação do peso molecular (PM).....	51
2.6	Produção e padronização do antígeno solúvel (AS)	51
2.6.1	Teste de identidade.....	52
2.6.2	Perfil protéico do AS.....	53
2.6.3	Especificidade da proteína.....	53
2.6.4	Avaliação semi-quantitativa.....	54
2.6.4.1	Imunodifusão radial simples.....	54
2.6.4.2	Titulação em bloco.....	55
2.7	Testes sorológicos.....	55
2.7.1	Soros de campo.....	55
2.7.2	Imunodifusão em gel de agar (IDGA).....	55
2.7.2.1	Reativos usados na IDGA.....	55
2.7.2.2	Realização do teste de IDGA.....	56
2.7.3	Imunofluorescência indireta (IFI).....	57
2.7.3.1	Purificação das imunoglobulinas de bovino	57
2.7.3.2	Produção de soros anti-soro total e anti-IgG bovina e ovina.....	58
2.7.3.3	Controle de especificidade dos antissoros.....	59
2.7.3.4	Purificação dos antissoros.....	59
2.7.3.5	Marcação das IgG de coelhos com isotiocianato de fluoresceína.....	60
2.7.3.6	Titulação dos conjugados para IFI.	61
2.7.3.7	Realização da IFI.....	61
2.7.4	Análise estatística.....	62
3	RESULTADOS.....	63
3.1	Cultura de células.....	63
3.2	Adaptação da cepa viral.....	63
3.2.1	Títulos infecciosos.....	64
3.2.2	Efeito citopático.....	64
3.2.3	Suspensões virulentas.....	67

3.3	Purificação viral.....	67
3.3.1	Microscopia eletrônica.....	68
3.3.2	Análise do ARN.....	73
3.3.3	Análise das proteínas.....	73
3.4	Antígeno solúvel (AS).....	79
3.4.1	Teste de identidade.....	79
3.4.2	Perfil proteico do AS.....	81
3.4.3	Especificidade da proteína.....	81
3.4.4	Avaliação semi-quantitativa.....	81
3.4.4.1	Imunodifusão radial simples.....	81
3.4.4.2	Titulação em bloco.....	82
3.5	Testes sorológicos.....	89
3.5.1	Imunodifusão em gel de agar (IDGA).....	89
3.5.2	Imunofluorescência indireta (IFI).....	89
3.5.2.1	Purificação das imunoglobulinas de bovinos	89
3.5.2.2	Produção, purificação e marcação das IgG de coelhos.....	90
3.5.2.3	Reação de IFI.....	90
3.5.3	Análise estatística dos dados sorológicos.	95
4	DISCUSSAO.....	100
5	CONCLUSOES.....	124
6	RESUMO.....	126
7	ABSTRACT.....	128
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	130

PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA UTILIZADAS *

AcM = anticorpos monoclonais
AFT = ácido fosfotúngstico
ARN = ácido ribonucléico
AS = antígeno solúvel
BHK = linhagem celular derivada de "baby hamster kidney"
C = concordância
COM = antígeno comercial
CNL = capacidade nominativa limitante de peso molecular
CsCl = cloreto de césio
DEH = doença epizoótica hemorrágica
DICC 50% = dose infectante cultura de células cinquenta por cento
DSS = dodecil sulfato de sódio
E = especificidade
ECP = efeito citopático
EGPA = eletroforese em gel de poliacrilamida
EIE = ensaio imuno enzimático
FC = fixação de complemento
FCM = fixação de complemento modificada
HP = hemoaglutinação passiva
IDGA = imunodifusão em gel de agar
IFD = imunofluorescência direta
IFI = imunofluorescência indireta
IgG = imunoglobulinas da classe G
IH = inibição da hemoaglutinação
IICA = Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura
ITCF = isotiocianato de fluoresceína
IV = intra-vascular
LA = língua azul

* A maioria das explicações encontra-se também no texto.

LANARA = Laboratório Nacional de Referência Animal
LARA = Laboratório Regional de Apoio Animal
LTc = linfócitos T citotóxicos
ME = microscópio eletrônico
MEM = "Minimum Essential Medium"
MI = microscópio invertido
Mr = mobilidade relativa
NADC = "National Animal Disease Center"
NaHCO₃ = bicarbonato de sódio
(NH₄)₂SO₄ = sulfato de amônio
NS = não estrutural
OE = ovo embrionado
P = proteína
PM = peso molecular (unidade = dalton, d)
S = sensibilidade
SCN = soro controle negativo
SCP = soro controle positivo
SG = saco da gema
SN = soro neutralização
TEMED = N, N, N', N' - tetrametil-etilenodiamino
TFS = tampão fosfato salina
Tris = tris-hidroximetilaminometano
Tris/HCl-Ca⁺² = tampão tris-hidroximetilaminometano/HCl
acrescido de íons cálcio
UV = ultra violeta
VDEH = vírus da doença epizootica hemorrágica
VERO = linhagem celular proveniente de rim de macaco *Rhesus*
VLA = vírus da língua azul
VLA-S4 = VLA, sorotipo 4
VP = "viral protein"
VPR- = valores preditivos dos resultados negativos
VPR+ = valores preditivos dos resultados positivos

1 INTRODUÇÃO

A língua azul (LA) está incluída na lista "A" de doenças infecciosas do "Office International des Epizooties", que reúne as enfermidades cujas consequências sócio-econômicas podem ser graves e de grande importância no comércio internacional de animais e de seus produtos⁴⁵.

As perdas econômicas provocadas por esta doença, que se caracteriza pela presença de lesões ulcerativas na mucosa oral e transtornos reprodutivos, não se prendem unicamente aos danos nos animais infectados, mas principalmente ao impacto econômico provocado no comércio de animais, na indústria da inseminação artificial, no mercado local e internacional de sêmen e germoplasma 25.77.82.118.153. Este comércio tem sido alvo de restrições cada vez maiores pelos países considerados livres da doença, ou por países que querem limitar o risco de entrada de novos sorotipos 13.28.54.77.153.161.163.

O Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA), através da Comissão Interamericana de Saúde Animal (COINSA), reconhecendo a importância dos problemas que a LA vem causando para a pecuária mundial e a grande polêmica existente em torno de muitas questões relativas à ocorrência desta doença, vem se empenhando no desenvolvimento de projetos envolvendo acordos internacionais, objetivando a implantação de técnicas diagnósticas que possibilitem o melhor conhecimento da

epidemiologia da doença na América Central e América do Sul (M.BEDOYA, 1988 - comunicação pessoal)

A Rede de Laboratórios de Diagnóstico de Saúde Animal da Area Sul ("RED SUR"), integrada por: Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, iniciou as discussões sobre este assunto em 1986 e 1987, por ocasião das reuniões LABSUR IV e V^{94.153}, preocupando-se principalmente com as discrepâncias encontradas nos resultados dos exames laboratoriais, que determinaram o sacrifício de animais de alto valor zootécnico, sem que talvez esta conduta tivesse sido necessária. Outro tema, abordado pelos representantes destes países, foi a padronização de técnicas sorológicas para o diagnóstico da doença, com o objetivo de unificação dos critérios de execução dos testes, produção de antígeno e interpretação dos resultados.

A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi a técnica escolhida para o início dos trabalhos, considerando a impossibilidade de realização de outros testes e pelo fato desta técnica ser de uso consagrado para triagem de soros, nos laboratórios mundiais de referência^{135.143}.

Todos os levantamentos realizados, no Brasil, até o momento, utilizaram antígeno viral solúvel importado do "National Animal Disease Center" - NADC, de Ames/USA^{12.44.45.46.47}, do "Veterinary Technology, Inc."/USA¹² ou do "Animal Research Institute" de Pirbright/England (PAULO ROCHE, 1988 - comunicação pessoal) e sugerem que a

frequência da infecção a nível de campo é bastante elevada, exigindo desta forma, maiores estudos que, no entanto, tornam-se limitados em função das dificuldades de obtenção de antígeno para a IDGA.

Diante destas limitações diagnósticas inerentes ao preparo do antígeno para IDGA, e outras possíveis técnicas que poderiam ser usadas para esta finalidade, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- 1 - Adaptação da cepa do Virus da Língua Azul (VLA), sorotipo 4, a cultivos celulares.*
- 2 - Purificação das partículas virais, identificação através de microscopia eletrônica e estudo do genoma e da proteína.*
- 3 - Produção experimental, padronização e estudo do antígeno solúvel para a IDGA, possibilitando sua utilização em larga escala.*
- 4 - Implantação da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), para o diagnóstico sorológico.*
- 5 - Comparação entre a prova de IFI e a prova padrão de IDGA e determinação dos parâmetros de validação da IFI, calculando-se Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valores Preditivos dos resultados positivos (VPR+) e negativos (VPR-) e Eficiência do teste ou Concordância (C), e ainda comparação dos resultados obtidos para os soros de bovinos e ovinos.*

A fim de facilitar a exposição, bem como elucidar alguns aspectos relacionados a esta doença, segue-se um relato geral dos dados mais relevantes encontrados na literatura.

1.1 Histórico

A língua azul foi reconhecida há mais de um século, no Sul da África. O primeiro relato deu-se em 1876 e a primeira descrição da doença foi feita por HUTCHEON, em 1881, conforme citação de HARDWICKE, 1980⁷⁷, e OBDEYN, 1987¹³⁶. A doença ficou restrita ao continente africano até 1943, quando foi, então, confirmada a primeira ocorrência no Chipre^{27.77.83}, fato este, que posteriormente, facilitou o reconhecimento da enfermidade em Israel (1951), no Paquistão (1955) e na Índia (1963)^{136.163}.

Em 1956, ocorreu um foco severo em Portugal e posteriormente na Espanha^{77.136.161}. Embora SCHUDEL, 1986¹⁶³ tenha feito referência a aparente erradicação desta doença na Europa, o risco existe, pela proximidade com o continente Africano¹⁶¹.

Nos Estados Unidos (EUA), o primeiro aparecimento ocorreu no Texas, em 1948 e, subsequentemente, na Califórnia em 1952, quando foi realizado o isolamento viral e, assim, pôde-se fazer a confirmação definitiva da doença^{28.39.77.83.136.163}. O Canadá, após evidências

sorológicas somente em animais importados, foi declarado livre em 1979¹⁵³.

Com relação à distribuição dos sorotipos, 24 reconhecidos internacionalmente, acredita-se que todos ocorram no Sul da África e, talvez, também no Oeste deste continente; sorotipos 1, 3, 4, 10, 12 e 16, no Oeste da Ásia; sorotipos 1, CSIRO 154 (provavelmente relacionado ao sorotipo 6), 20 e 21 no sudoeste da Ásia e Austrália; sorotipos 4, 12 e 20, no Japão; sorotipos 5, 10, 11, 13 e 17 nos Estados Unidos e sorotipo 2, apenas na Flórida/EUA ^{13.39.65.138}.

Levantamento sorológico realizado na região do Caribe e América do Sul, por GUMM e col., 1984⁷⁵, indicou a prevalência dos sorotipos 6, 14 e 17 do VLA na América Central entre os anos de 1981 e 1982. Mais recentemente, há informações de isolamento do sorotipo 1 na América Central, em 1986, os sorotipos 3 e 6, na mesma região, e sorotipos 3 e 12 no Caribe, em 1987, além dos outros, referidos anteriormente^{40.54.81.119}.

Na América do Sul, têm sido relatadas suspeitas de casos clínicos no Peru e Chile^{77.138.153}. Levantamento sorológico realizado em ovinos do Chile demonstrou uma prevalência de anticorpos em 6,5%, sem, contudo, terem sido feitos isolamentos de vírus na área estudada¹⁵⁰. Os sorotipos 2 e 16 foram identificados no Paraguai e Chile¹⁵³, bem como os sorotipos 6, 12, 14, 16, na Guiana, no Suriname e na Colômbia^{75.80.81}. A Argentina e o

Uruguai, até o momento, têm sido considerados países livres da infecção, com base em resultados sorológicos negativos em áreas de alto risco, segundo afirmativa de SCHUDEL, 1986¹⁵³.

A língua azul foi notificada ao "Office International des Epizooties" pelo Brasil, em 1978, com base em evidências sorológicas^{44.45.46.47}.

MOREIRA verificou a presença de anticorpos para o VLA em soros sanguíneos de bovinos dos Estados do Amazonas, Pará, Minas Gerais e São Paulo e Territórios de Roraima e Amapá, conforme citação de CUNHA e col.⁴⁴ e DEAK & ARITA⁴⁷.

CUNHA e col.⁴⁴, trabalhando com 553 soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro, coletados entre 1979 e 1981, encontraram 40,86% de animais com anticorpos contra o VLA.

Em 1982, realizou-se, nos EUA, o primeiro e único isolamento do VLA em bovino proveniente do Brasil, sendo identificado, então, o sorotipo 47³.

No ano seguinte, DEAK e ARITA⁴⁷ detectaram anticorpos para o VLA em soros de antílopes importados dos EUA.

Na região do Vale do Paraíba, São Paulo, foram relatados casos de lesões ulcerativas em bovinos, que se assemelhavam às lesões provocadas pelo VLA (M.T.TERRERAN, 1985 - comunicação pessoal)

No Estado do Rio de Janeiro, segundo informações de médico veterinário do Serviço de Defesa

Sanitária Animal (J.D.PEIXOTO, 1987 - comunicação pessoal) ocorreu em uma criação de ovinos, durante dois anos consecutivos, uma doença que apresentava as mesmas características da língua azul, nesta espécie animal.

Em nenhum dos dois casos acima citados foi possível o isolamento de vírus ou a identificação de anticorpos que confirmassem a suspeita clínica, embora tenham sido utilizados os procedimentos usuais de laboratório.

CUNHA e col., em 1987⁴⁵, em inquérito sorológico em soros de bovinos dos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, encontraram um percentual de positividade da ordem de 53,73%, 19,81%, 37,35% e 1,22%, respectivamente, enquanto um levantamento preliminar, realizado no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em cerca de 1.000 animais do Estado do Rio Grande do Sul, revelou um índice de positividade sorológica de 9,07% (PAULO ROCHE, 1988 - comunicação pessoal).

ARITA & DEAK, em 1988¹², examinando 2.372 amostras de soros de animais provenientes de diversos Estados, encontraram 37,97% de positividade em bovinos, 17,34% em bubalinos, 13,39% em ovinos e 2,24% em caprinos.

CUNHA e col., em 1988⁴⁸, testando amostras de caprinos e ovinos do Estado do Rio de Janeiro, encontraram um percentual de positividade de 44,08% em soros de caprinos e 24,24% em soros de ovinos. Estes autores sugerem a

disseminação da doença e a ocorrência de infecções inaparentes nestas espécies animais.

1.2 Agente etiológico

A língua azul é causada por um vírus classificado como membro da família Reoviridae^{34,83,108,129,133,170,171}, gênero *Orbivirus*. O termo *Orbivirus* foi proposto por BORDEN e col., em 1971, citados por GORMAN, 1979⁶⁷, para descrever um determinado número de vírus transmitidos por insetos, que pelas suas características físico-químicas e morfológicas formavam um grupo distinto de vírus. O nome do gênero deriva do latim *orbis*, que significa anel ou círculo, em consequência da configuração apresentada pelo nucleocapsídeo^{34,53,67,174}.

Há, pelo menos, 12 subgrupos sorológicos enquadrados no gênero *Orbivirus*, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus¹²⁹, dos quais o VLA é o vírus-padrão^{60,67,88}. Embora não tenha sido encontrado antígeno de gênero comum, os vírus dentro de cada subgrupo possuem antígenos detectáveis pelos testes de fixação do complemento, imunodifusão em gel de agar e imunofluorescência, havendo um grande número de reações cruzadas em testes sorológicos, o que tem criado dificuldades na classificação dos *Orbivirus*^{33,49,67,69,108,119}. O VLA contém pelo menos dois antígenos de importância diagnóstica, um comum aos vírus do

grupo e outro associado a sorotipo-especificidade 33.34.50.70.127.131.172.

Até o presente momento são reconhecidos, internacionalmente, 24 sorotipos do VLA, identificados através de testes de neutralização e da resposta imune específica ao sorotipo 33.42.67.108.131.140. Ocorre grande variação dentro dos sorotipos, em virtude da possibilidade de recombinação gênica entre eles 41.42.67.137.154.

As características do VLA, conforme indicadas pela 4ª Reunião do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus¹²⁹ estão resumidas no quadro 1.

QUADRO 1: Características gerais do vírus da língua azul*

PROPRIEDADES DAS PARTICULAS VIRAIS

Forma: icosaédrica, quase arredondada
Diâmetro: cerca de 68 nm
Peso molecular (PM) aproximado: $60,00 \times 10^6$ d
Densidade: $1,38 \text{ g/cm}^3$
Coeficiente de sedimentação: 550 S
Capsídeo protéico constituído de duas camadas
Partículas sem capsídeo externo são chamadas "core"
Capsídeo interno com 32 subunidades, com conformação circular na superfície
Proteínas: 7 proteínas estruturais, representando 80% do PM total do vírus
Ácido nucléico: ácido ribonucléico (ARN) linear de fita dupla, com 10 segmentos, representando 20% do PM total do vírus

PROPRIEDADES FISICO-QUIMICAS

Perda da infectividade a pH 3,0
Solventes lipídicos provocam redução da infectividade, da ordem de 10 vezes

REPLICAÇÃO

Citoplasmática: a morfogênese é acompanhada da formação de filamentos regularmente estruturados sob forma de corpúsculos de inclusões fibrilares e túbulos.

* 4ª. Reunião do Comitê de Taxonomia de Vírus¹²⁹

O capsídeo viral é composto de duas camadas protéicas, sendo que a interna apresenta uma estrutura capsomérica com 32 capsômeros, chamada nucleocapsídeo, o qual se encontra circundado por uma capa externa difusa, menos estruturada^{29,34,91,131,174}.

O genoma do VLA consiste de ARN linear de fita dupla, com 10 segmentos de diferentes mobilidades eletroforéticas e PM variando entre $2,5 \times 10^6$ d (segmento 1) e $0,3 \times 10^6$ d (segmento 10), com PM total do genoma do sorotipo 10 entre $11,0$ e $12,5 \times 10^6$ d, conforme determinado por MARTIN & ZWEERINK¹²⁸ e VERWOERD e col.¹⁷², em 1972. Devido a sua natureza segmentada, o ARN do VLA pode ser caracterizado através da eletroforese, que permite detectar variações ocorridas entre os segmentos dos genomas dos diferentes sorotipos, bem como em diferentes cepas isoladas dentro do mesmo sorotipo^{34,39,67,108,155}.

SQUIRE e col., em 1983¹⁵⁵, analisando a relação entre as diferentes cepas isoladas durante vários anos, nos EUA, não conseguiram estabelecer padrões eletroforéticos que determinassem alguma correlação direta entre o perfil eletroforético e o sorotipo da amostra viral, a espécie animal e a região geográfica ou ano em que o vírus foi isolado. Por esta razão, o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) torna-se limitado, ou mesmo inadequado, para a diferenciação entre cepas do VLA e entre os orbivírus relacionados, que apresentam o mesmo número de

segmentos de ARN, como é o caso do subgrupo Eubenangee 39, 67, 68, 69, 108, 155.

As amostras de campo apresentam grande variação no padrão eletroforético dos segmentos do genoma, refletindo a diversidade genética existente no subgrupo sorológico do VLA, independentemente da variação antigênica, não existindo um padrão eletroforético característico destes segmentos para cada sorotipo^{39, 67, 155}.

Acredita-se, atualmente, que o genoma do VLA codifique pelo menos 10 proteínas, isto é, cada segmento de ARN deve codificar uma proteína, desconhecendo-se, entretanto, se as proteínas adicionais são únicas ou são produtos de tradução incompleta ou produtos modificados pós-tradução^{34, 67}. Está claro, porém, que o tamanho do segmento do ARN não está necessariamente relacionado ao tamanho do polipeptídeo codificado.

De particular significado é a identificação do segmento que codifica o polipeptídeo responsável pela tipo-especificidade. Para o sorotipo 17, parece ser o VP3^{34, 42}, que é codificado pelo segmento 2 do genoma, enquanto que, para os sorotipos 1 e 4, parece ser o VP2^{42, 92, 133}, codificado também pelo segmento 2 do genoma viral (Figura 1). HUISMANS & CLOETE, em 1987⁹², trabalhando com o sorotipo 4, demonstraram que os segmentos 5 e 6 codificam as proteínas NS1 e P5, respectivamente, diferindo da codificação apresentada pelos autores^{34, 133}, cujos dados foram utilizados para a montagem da figura 1. Esta diferença

pode ser, em parte, devida ao sorotipo testado, ao sistema de gel usado na análise eletroforética e aos diferentes sistemas de nomenclatura utilizados para os polipeptídeos do VLA^{34.42.133}.

A nomenclatura mais citada na literatura se baseia na proposta de VERWOERD e col., 1972¹⁷², que utiliza o número da proteína precedido pela sigla P (ver letra A, Quadro 2), embora a grande maioria dos autores empregue a mesma numeração, precedida pela sigla VP. APPLETON & LETCHWORTH, 1983¹¹, utilizam uma sequência numérica diferente, precedida da sigla VP (ver letra B, Quadro 2), juntamente com o PM das proteínas e a localização correspondente no virion. A nomenclatura usada no presente trabalho, durante as citações, é a original dos respectivos autores, porém quando se faz referências às proteínas virais usa-se a nomenclatura citada por VERWOERD e col., 1972¹⁷², sendo a sigla P, precedida pela sigla V, ou seja VP, seguida do número correspondente ao segmento protéico.

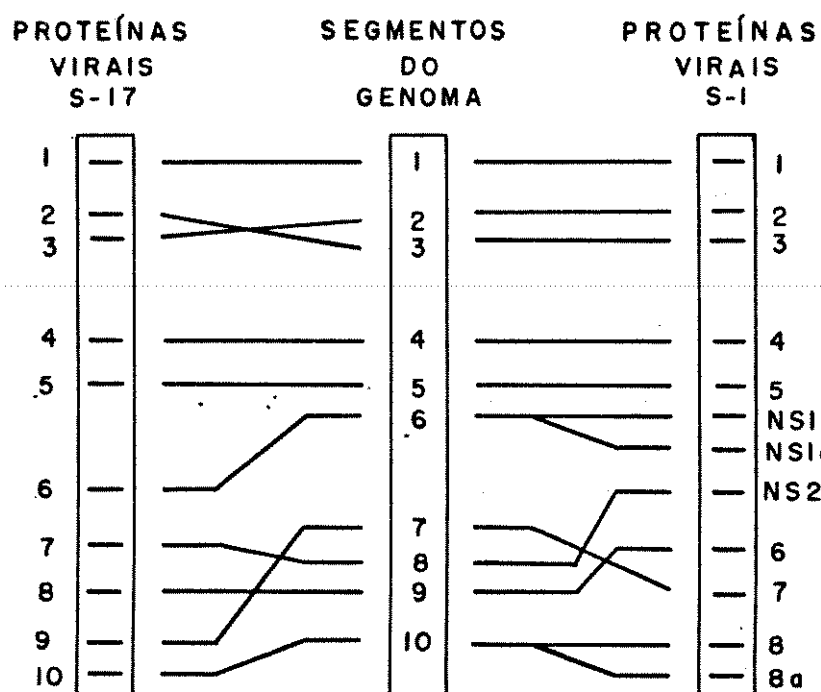


FIGURA 1: Esquema do genoma segmentado do VLA e correspondência com as proteínas codificadas pelos diferentes segmentos, de acordo com GRUBMAN e col., 1983, citados por CAMPBELL & GRUBMAN, 1985³⁴ e MERTENS e col., 1984¹³³.

QUADRO 2 - Nomenclaturas mais utilizadas, PM e localização das proteínas do VLA no virion³⁴

Nomenclatura		PM (x 10 ³ d)		Localização	
A	B	A	B	Estrutural	Não-estrutural(NS)
P1	VP1	140	137	NC	-
P2	VP3	110	104	CE	-
P3	VP2	101	108	NC	-
P4	VP4	82	82	NC	-
P5	VP5	61	69	CE	-
P5 _a	VP8	54	47	-	tubulos
P6	VP6	42	57	NC	-
P6 _a	VP7	40	51	-	túbulos
P7	VP9	29	44	NC	-
-	VP10	-	24	-	desconhecida

A = VERWOERD, 1972¹⁷²

B = APPLETON e LETCHWORTH, 1983¹¹

NC = nucleocapsídeo

CE = capsídeo externo

A estrutura protéica do VLA, analisada por EGPA, tem mostrado 7 polipeptídeos com PM variando de 29 a 140 x 10³ d^{34.172}. A capa externa difusa é constituída de duas proteínas, VP2 e VP5. A proteína VP2 localiza-se mais externamente na superfície do virion e possui determinantes antigênicos responsáveis pela especificidade de sorotipo e virulência^{33.34.42.67.77.91.108.140}. Com relação a VP5, MERTENS e col., em 1984¹³³, e JEGGO, em 1986⁹⁸, relataram a possibilidade de seu envolvimento com a especificidade de sorotipo, através de interações funcionais com a VP2 e indução de anticorpos sorotipo específicos, embora vários outros autores não tenham conseguido demonstrar qualquer contribuição desta proteína na expressão da especificidade de sorotipo, nem o envolvimento de anticorpos específicos para esta proteína, na neutralização viral^{42.79.91.92.127.131}.

Em vários trabalhos verificou-se que a VP5 apresentou características comuns entre vários sorotipos testados, bem como a presença de determinantes antigênicos grupo-específicos. Esta proteína mostrou grau de reação semelhante entre soros homólogos e heterólogos e foi a proteína viral que apresentou maior variação de PM, entre os vários sorotipos testados^{42.79.88.91.93.127.131.133}.

O capsídeo interno viral é constituído de cinco proteínas: VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7, sendo que VP3 e VP7 são as principais^{34.91.93.111}.

A proteína VP7 é considerada, por muitos autores, como o mais importante antígeno sorogrupo-específico para o VLA^{91.111.136.154} e o principal antígeno envolvido na reação de fixação do complemento^{34.80.108}, sem contudo descartar a grande participação da proteína VP3 e das outras proteínas virais na resposta grupo-específica^{67.80.93.108.111}. A VP3, quando analisada através de EGPA, migra associada à VP2, por apresentar PM muito próximo desta proteína e tem demonstrado estrutura altamente conservada entre os sorotipos^{82.92.93.131}.

Os polipeptídeos VP7 e VP3 apresentam determinantes antigênicos comuns a vários sorotipos do VLA, e participam de reações cruzadas entre os orbivírus relacionados, principalmente através das técnicas de fixação do complemento, imunofluorescência, imunodifusão e imunoprecipitação^{34.67.89.90.92.108.111.131}.

As proteínas VP1, VP4 e VP6, do capsídeo interno viral também podem conter determinantes grupo-específicos e grau de conservação estrutural variável entre si^{67.89.92}.

A análise das proteínas codificadas pelo vírus em células infectadas permite detectar, além das proteínas estruturais, quatro proteínas não-estruturais, denominadas NS1 ou P5_a; NS2 ou P6_a; NS3 e NS4^{34.35.51.67.87.89.131.133.169}.

As proteínas NS1 e NS2 constituem os principais componentes presentes no citoplasma de células infectadas pelo VLA, sob a forma de corpúsculos de inclusão fibrilares e túbulos, constituídos de proteínas codificadas pelo vírus^{34.52.87.89.90.93}, e que se apresentam como estruturas altamente conservadas nos diversos sorotipos^{52.87.92.93}. Há evidências de que a proteína NS1 seja codificada pelo segmento 5 ou 6 do genoma viral, conforme mencionado anteriormente, juntamente com a proteína P5^{34.42.87.92.133}, que é sintetizada em alta frequência no ciclo replicativo, quando comparada aos outros polipeptídeos virais^{34.87.88}. Esta proteína está imunologicamente relacionada aos microtúbulos do VLA e do vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH)^{52.88.89.90.92.131}.

A proteína NS1 apresenta igual precipitação frente a soros homólogos e heterólogos entre os vários sorotipos do VLA⁹⁰. Estudos recentes sugerem homologia entre esta proteína e a VP7 e, em menor extensão, à VP3, que também têm suas presenças associadas aos túbulos e corpúsculos fibrilares^{51.88.93.131}.

As relações estruturais demonstradas entre estas proteínas provavelmente justifiquem o grande número de reações cruzadas observadas entre os diferentes sorotipos do VLA e entre os orbivírus relacionados, especialmente o VDEH^{11.33.49.89.90.92.170}.

1.3 Características principais da doença

A língua azul ocorre em uma grande variedade de ruminantes domésticos e selvagens, sendo a espécie ovina a mais atingida. Nas espécies bovina e caprina, a infecção é, geralmente, subclínica^{9,27,28,83,115,117,135,138}.

Em ovinos, a doença atinge animais de todas as idades, mas em áreas endêmicas, em geral, somente os cordeiros são atingidos^{135,138,153}. Tem sido relatada uma variação significativa entre a susceptibilidade de raças, nesta espécie^{48,80,81,77}. Os autores sugerem que a diferença na expressão dos sintomas pode ser, em parte, função de diferenças genéticas na resposta imune celular e humoral^{135,140,154} e da baixa virulência de certas cepas virais^{115,138}.

O período de incubação da enfermidade, nos ovinos, varia de seis a oito dias. Os sintomas iniciais são: febre, aumento da frequência respiratória, salivação espumosa, hiperemia e congestão da mucosa oral e depressão^{77,112,118,128,135,153}. A temperatura retal varia de 40 a 41,7°C, acompanhando o pico de viremia^{77,83,135}. A hiperemia e a congestão dos lábios e das mucosas oral e nasal podem variar de ligeiro aumento da tonalidade vermelho escuro, até a coloração cianótica, de onde se origina o nome "língua azul"^{28,77,135}.

Nos animais atingidos, na fase aguda, há uma intensa congestão e edema da mucosa oral, que evoluem

eventualmente para ulcerações necróticas dos lábios, pálato dental, língua e gengiva, podendo ocorrer ainda laminite, que é extremamente variável no seu aparecimento, e diarreia sanguinolenta^{77.128.135.136.153}.

A mortalidade ocorre principalmente em ovinos, variando de acordo com as condições ambientais e climáticas, a patogenicidade da cepa viral^{27.44.135.141}, o estresse ao qual o animal foi submetido^{135.140} além dos fatores responsáveis pelas complicações secundárias, como a broncopneumonia, resultante da contaminação por aspiração do conteúdo ruminal e a degeneração da musculatura esquelética, inclusive do músculo cardíaco, que são, provavelmente, as principais causas de morte dos animais^{77.128.136}.

Nos bovinos, a LA é geralmente subclínica; os sintomas, quando ocorrem, são mais leves e menos frequentes que em ovinos^{28.48.77.115.135.136.153}. O bovino afetado pode apresentar hipertermia, com a temperatura variando entre 40,5 e 41,6°C e leucopenia, correspondentes ao pico de viremia, como em ovinos^{28.115.117.135}. A persistência do vírus no sangue dos bovinos é muito mais prolongada, já que o isolamento de vírus, nesta espécie animal, por mais de um ano, tem sido relatada^{28.115.118.123.140.141}, enquanto que, em ovinos, varia em torno de apenas 30 dias^{48.136}.

Lesões características da LA, em bovinos, consistem na inflamação da papila bucal e úlcera necrótica no pálato dental^{27.28.118.153}, que localizam-se, com maior frequência, na parte anterior da boca^{27.77.112.117}. Em casos

mais severos, além da congestão e edema da membrana mucosa, desenvolvem-se crostas que podem se desprender, deixando uma superfície desnuda, que propicia o aparecimento de infecções causadas por contaminações secundárias^{28.135.153.}

Laminite, miosite e coronite são lesões que ocorrem geralmente em bovinos^{27.28.77.112.117.} O aborto, a infertilidade e as deformações fetais congênitas como prognatismo, encefalites necrohemorrágicas, meningites supurativas e não-supurativas, cistos cerebrais e, mais frequentemente, hidroencefalia são observados em ruminantes, principalmente em bovinos^{15.36.112.116.118.121.122.135.} Em vacas leiteiras, crostas, provavelmente resultantes de trauma do epitélio sensibilizado, podem levar a complicações secundárias, tais como mastites^{38.135.}

A doença em bovinos tem sido associada com a hipersensibilidade tipo I. Os sintomas clínicos, como dermatites e/ou úlceras, caracterizadas histologicamente por infiltração perivascular de eosinófilos, linfócitos, mastócitos e histiócitos, reforçam esta idéia^{8.9.82.140.154.157.} A presença de imunoglobulinas da classe E (IgE) na circulação sanguínea, sugere que estas possam estar envolvidos nas reações biológicas durante a fase aguda e recorrente da infecção viral em bovinos, não se excluindo a possibilidade de que estes anticorpos possam se fixar em mastócitos teciduais^{8.106.140.154.157.} ANDERSON e col., em 1985⁹, também demonstraram correlação direta entre o aparecimento de sintomas clínicos e o aumento do nível

sérico de IgE, a presença de dermatite eosinofílica e alta concentração de histamina na pele. Estes autores concluíram que o desenvolvimento de sintomas da doença parecia estar relacionado à sensibilização prévia pelo VLA, ou por *Orbivirus* relacionados.

A atividade de anafilaxia cutânea passiva não tem sido, até o momento, demonstrada em ovinos, sugerindo que a reação de hipersensibilidade tipo I não contribuiria para o desenvolvimento dos sintomas da doença, nesta espécie animal^{140,154}.

O mecanismo pelo qual, se estabelece o estado de portador, não tem sido bem definido e, na espécie bovina, nem sempre têm sido detectados anticorpos^{27,73,115,135,154}.

O vírus da LA, em animais com infecção subclínica, está associado à membrana citoplasmática, sendo encontrado primariamente nos eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, monocitos e no revestimento endotelial dos vasos sanguíneos^{27,82,128,154,175,176}. Vários autores^{6,82,128,154,158,175,176} admitem que o vírus se replique nestas células, podendo expressar antígenos virais na superfície das mesmas.

1.4 Resposta imune

A resposta imune, envolvendo a participação de populações de linfócitos T e B, tem sido demonstrada em bovinos e ovinos infectados pelo VLA. As respostas de ambas

as populações de linfócitos são dirigidas para determinantes antigênicos presentes em cada subunidade viral, especialmente às proteínas localizadas na superfície das partículas virais^{60.124.140.154.158.159}. As classes de imunoglobulinas que têm sido relatadas são as IgM, IgG, e IgE^{8.9.138}. Estas respostas específicas para as proteínas do VLA no hospedeiro, bem como, os mediadores endógenos liberados podem modular a expressão da patogenicidade viral, bem como da resposta imune protetora^{8.34.61.82.97.140.154.158}.

A contribuição da resposta imune celular, em comparação com a resposta imune humoral, não tem sido bem determinada^{34.60.98.108.124}. Os anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos exercem um papel importante na proteção contra a doença^{34.60.98.140}, embora o grau de proteção não esteja correlacionado diretamente com o nível sérico destes anticorpos^{98.108}.

Por outro lado, a participação da imunidade celular na proteção da doença também tem sido relatada^{34.60.97.98.108.140.157}. Linfócitos T citotóxicos (LT_c) têm sido observados em camundongos e ovinos^{60.96.97.98.158.159}, atuando na busca de células infectadas, carregando na sua membrana antígenos virais específicos, matando seletivamente estas células^{60.97.108}. Os LT_c apresentam reação cruzada quando testados frente a células-alvo infectadas com sorotipo heterólogo do VLA^{60.61.82.96.97.98.108.154}.

Tem sido difícil demonstrar os LT₀ em bovinos¹⁰⁸. STOTT e col. em 1985¹⁵³, constataram elevada estimulação de linfócitos em bovinos imunizados com vacinas inativadas, acompanhada de supressão desta mesma atividade no momento da descarga viral. SCHULTZ & GUIDER, 1987¹⁵⁴, admitem que, se os bovinos têm ausência de resposta imune a este vírus, ou têm resposta fraca, o estado de tolerância imunológica poderia ocorrer.

Os aspectos imunológicos da LA em bovinos, principalmente no que diz respeito à persistência simultânea de anticorpo específicos e partículas virais, estado de tolerância imunológica, ausência ou fraca resposta imune celular, são pouco esclarecidos^{27.34.82.108.112.117.140.154}. Várias hipóteses têm sido levantadas, tais como: deleção clonal, mecanismos supressores relacionados à modulação da atividade de células T auxiliares, participação de anticorpos idiotípicos, hipersensibilidade mediada por IgE, levando à expressão da doença clínica e modulação supressiva da imunidade protetora^{8.9.80.81.82.97.140.154.158}.

O VLA, assim como outros vírus constituídos de ARN bicatenário, é considerado potente indutor de interferon alfa e beta. Ovinos e bovinos são capazes de desenvolver os dois tipos de interferon nos estágios iniciais da doença, mas parece não estar totalmente esclarecida a participação desta substância na prevenção ou recuperação da enfermidade ^{59.82.96.97.123.154}.

1.5 Epidemiologia

A forma mais frequente de transmissão da língua azul é através de insetos vetores 8.27.71.77.153.161.174. O vírus é mantido na natureza por ciclos alternados entre o vetor biológico e hospedeiros mamíferos, ruminantes^{27.115.161}.

O gênero mais citado entre os vetores artrópodes é o *Cullicoides*^{27.48.77.117.135.138.174}; as espécies têm variado, nos distintos continentes. Na Africa, o vetor mais clássico é o *C. imicola*; na Asia e Austrália, o *C. brevitarsus*; nos Estados Unidos, o *C. variipennis* 14.119.135.161 e, exclusivamente na Flórida, foi relatado o *C. insignis* como transmissor da doença³⁹, sendo também descritos alguns insetos hematófagos, como o *Melophagus ovinus*, *Hematopinus eurytermus* e *Ornithodoros coriaceus*, dentre outros^{27.28.77.121}. No Continente Sul Americano, poucas tentativas têm sido feitas para relacionar a presença de vetores com a ocorrência de LA. CUNHA e col., 1987⁴⁵, referem-se à presença de insetos deste gênero, tais como, *C. insignis*, *C. paraensis* e *C. furens* no sul do Brasil e Argentina.

O inseto, após picar o animal infectado, alcança o seu potencial máximo de transmissão entre 10 e 14 dias^{27.121}. O vírus, segundo BOWNE, 1968²⁸, replica-se, principalmente, nas glândulas salivares do artrópode.

A língua azul é uma doença de natureza sazonal e, como nas outras arboviroses, sua ocorrência é maior durante os meses quentes e chuvosos, quando a proliferação dos vetores é maior 27,63,115,117,141,181,173. A temperatura ótima de atividade destes vetores situa-se entre 13 e 35 °C e seu ataque se realiza ao amanhecer e ao anoitecer. Há evidências de que insetos infectados são carregados a grandes distâncias pelos ventos. A disseminação do vírus, entre os vetores, depende do número de insetos e do seu "habitat", sendo necessários um grande número e um alto título viral, para que exista a possibilidade de ocorrer a transferência^{138,181}.

A doença não é transmitida por contacto, podendo ocorrer, entretanto, pela transferência de sangue a partir de animais infectados^{6,27,116,117,136,139}.

A transmissão vertical tem sido observada em ovelhas e vacas infectadas, natural ou artificialmente 28,31,55,77,115,118,135. A transmissão transplacentária depende das características da cepa viral, da concentração do inóculo e do estágio da gestação^{38,55,121,132}, sendo que, no início, a infecção pode provocar a morte do embrião, levando ao aborto, à reabsorção ou mumificação do feto^{15,28,29,98,112,117,138,139}.

No caso de sobrevivência do feto, pode se instalar um estado de tolerância imunológica, em que o animal ao nascer não apresenta capacidade de produzir anticorpos específicos para o VLA, situação muito comum e de

grande importância epidemiológica 98.112.115.121.135.139. Bovinos que sobreviveram à infecção intrauterina adquirem o estado de portador, conforme sugerido anteriormente, não expressando sintomas nem conversão sorológica, apresentando, no entanto, viremia esporádica, que favorece a disseminação do vírus, passando estes animais a se constituírem nos principais responsáveis pela manutenção e difusão da doença no campo 28.29.98.115.117.124.138.139.156.

O cruzamento natural pode ser considerado uma forma alternativa de transmissão da enfermidade, levando em conta que já foi isolado vírus a partir de sêmen de animais inoculados experimentalmente 6.26.31.77.117.122.135.140.156.

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da LA pode ser feito através da observação dos sintomas clínicos, das lesões anátomo-patológicas, do isolamento e identificação do vírus ou pela demonstração de anticorpos específicos no soro sanguíneo de animais suspeitos 27.28.38.48.77.105.112.117.139.156.

Os sintomas clínicos e as lesões anátomo-patológicas são muito incipientes e, devido a existência de infecções semelhantes em ruminantes - tais como a febre aftosa, a estomatite vesicular, a diarreia viral bovina, a febre catarral maligna, a rinotraqueíte infecciosa bovina, o ectima contagioso dos ovinos, a fotossensibilização, e outras causadas por orbivirus relacionados, principalmente a

doença epizootica hemorrágica (DEH) - tornam necessário o diagnóstico diferencial^{27.28.46.77.134.153.157.}

As amostras a serem coletadas para o diagnóstico laboratorial devem constar, preferencialmente, de sangue total fresco, com e sem anticoagulante, coletado de animais na fase febril, soros pareados ^{27.28.135.147.157} sêmen de touros^{82.117.139.176}, baço, medula óssea e linfonodos de animais mortos na fase aguda, bem como sangue com anticoagulante, baço, pulmões, medula óssea, linfonodos, encéfalo e soro de animais abortados^{36.122.135.138.148.153.}

O isolamento e a identificação viral são de vital importância no diagnóstico da língua azul, para a confirmação definitiva da doença^{117.122.136.139.} O método inicialmente utilizado foi a inoculação do material suspeito no hospedeiro natural, ou seja, o ovino ^{27.28.31.105.141.}

A propagação do VLA em ovos embrionados (OE) foi referida, pela primeira vez, por MASON e col., em 1940, e o efeito da temperatura de incubação na replicação viral do VLA, neste substrato, foi estudado por ALEXANDER, em 1947, que estabeleceu a temperatura de 33,6 °C como a ideal para a propagação, conforme citados por GOLDSMITH & BARZILEI, 1985^{es}. As vias de inoculação em OE são a membrana cório-alantóide e o saco da gema (SG)^{31.58.66.128}, tendo sido desenvolvidas duas técnicas para inoculação por via intravenosa (IV) ou vascular, descritas por GOLDSMITH & BARZILEI^{es} e FOSTER & LUEDKE^{es}, em 1968, usando embriões de 11 a 13 dias de incubação. A via IV tem sido considerada,

por vários autores, como mais sensível que a via SG, e de sensibilidade equivalente à inoculação em ovinos^{68,105,115,121,136}.

O uso de cultivos celulares para a propagação do VLA vem sendo cada vez mais enfatizado^{122,126,135,144}. O VLA cresce em várias linhagens: BHK ("Baby Hamster Kidney"), VERO^{59,105,153}, LIC-MK₂, CV 1P (derivadas de rins de macaco), CSL 503 (proveniente de pulmão de feto bovino), L 929 (derivada de fibroblasto de camundongos), SVP ("Super VERO Porcine Stable Cell"), C 6/36 ("*Aedes albopictus* cell"), cultivo primário de testículo bovino^{31,105,138,173}, células de medula óssea bovina, cultura de macrófagos de bovinos, cultura de anéis traqueais, IB-RS-2 (rim de suíno)¹³⁸, MVPK ("Mengelin-Vaughn Porcine Kidney") e MDBK ("Madin-Darby Bovine Kidney")^{43,153}, dentre outras ^{59,105,122,137}.

Apesar de todos estes métodos já descritos para a propagação do VLA, e a existência de uma grande variedade de linhagens celulares sensíveis, a recuperação e o isolamento primário deste vírus, a partir de diferentes materiais, ainda representa uma séria dificuldade^{6,31,38,112,122,141}.

O uso de métodos combinados para o isolamento do VLA, como por exemplo a utilização de ovos embrionados e cultura de células, vem sendo adotado na maioria dos laboratórios de diagnóstico, a partir de amostras coletadas de animais suspeitos, animais importados e/ou destinados à

exportação, e doadores de sêmen^{105.112.141.153}. COLLISON & BARBIER, em 1985³⁸, utilizaram uma combinação de métodos que já vinha sendo empregada por GIBBS e col., em 1983⁶⁵, fazendo inoculações sequenciais em OE, pela via IV, seguida de passagens em cultivos celulares intercaladas ou não com inoculação pela via SG, em OE de 6 a 8 dias de incubação, obtendo diferentes resultados com os distintos procedimentos usados.

Após o isolamento, os antígenos virais são identificados nos cultivos celulares infectados, principalmente pela imunofluorescência direta^{144.146.105}, através de técnicas imunoenzimáticas^{38.112} e pela detecção dos componentes do genoma ou das proteínas virais, através de EGPA¹⁵⁶ e, mais recentemente, pela clonagem molecular^{158.167}.

O diagnóstico sorológico da LA é feito com base em técnicas sorogrupo-específicas e sorotipo-específicas^{77.105.115.141.153}. Os testes sorogrupo-específicos são os mais utilizados. Há um grande número de técnicas descritas na literatura, dentre as quais se encontram a imunodifusão em gel de agar^{33.72.74.101.103} a imunofluorescência^{100.144.146.147}, a fixação do complemento^{24.33.35}, a hemólise em gel¹⁰⁴ e o ensaio imunoenzimático^{3.4.5.10.38.84.120}.

A IDGA para o diagnóstico da LA tem sido mundialmente utilizada em levantamentos sorológicos, para determinar a distribuição e extensão

da atividade viral em rebanhos bovinos e ovinos 28,44,45,64,135,141. Esta técnica foi introduzida pelo imunologista sueco OUCHTERLONY, conforme citação de BIER e col., 1982²⁰ e TIZARD, 1985¹⁸⁸.

Na aplicação desta técnica para o diagnóstico da LA, os estudos têm sido direcionados, principalmente, para a preparação antigênica a ser utilizada, pois dela depende significativamente o sucesso do teste.

A IDGA para o diagnóstico da língua azul foi primeiramente estudada por KLONTZ e col., em 1962¹⁰⁸, com o objetivo de detectar anticorpos específicos para o VLA em ovinos infectados. Estes autores utilizaram antígenos preparados em cérebros de camundongos (de 2 a 4 dias de idade), inoculados pela via intracerebral, em embriões de galinha inoculados por via SG, e em culturas secundárias de rim de bovino.

JOCHIM & CHOW, em 1969¹⁰¹, estabeleceram um micrométodo onde o antígeno utilizado foi preparado a partir do fluido de cultura de células infectadas com VLA. A fração infectante foi separada da fração solúvel e concentrada aproximadamente 20 a 40 vezes em relação ao volume original.

WANG e col., em 1972¹⁷⁴, seguindo a mesma linha de raciocínio, e trabalhando com preparações não purificadas, semi-purificadas e purificadas, demonstraram a utilidade deste antígeno no diagnóstico da infecção em animais.

JOCHIM, em 1976¹⁰², fez algumas tentativas com o objetivo de melhorar a pureza das preparações antigênicas usadas em IDGA para o diagnóstico da língua azul. Uma delas foi a implantação do sistema de ultrafiltração seletiva em membranas. Dando sequência ao processo, o material solúvel sofria uma concentração em torno de 100 vezes e, opcionalmente, era submetido a cromatografia em Sephadex G-200. Outra tentativa foi a preparação do antígeno a partir do material viral associado às células, com o objetivo de encontrar uma alternativa para uso em IDGA, bem como para a realização de estudos de purificação que eram escassos em antígenos desta origem.

Posteriormente, GUMM & NEWMAN, em 1982⁷⁴, desenvolveram métodos de purificação do antígeno de grupo, utilizando colunas de Sepharose 4B e eletrofocalização com anfólitos em gradiente de pH entre 5 e 7.

HUBSCHLE & YANG, em 1983⁸⁵, trabalharam com a proteína P7, pela purificação em coluna de Sephacryl S-200 e cromatofocalização, sendo que, INUMARU e col., em 1987⁸⁵, utilizaram a proteína P3, como antígeno, para detecção de anticorpos contra o VLA.

A identificação do VLA e a detecção de anticorpos específicos por imunofluorescência podem ser realizadas através da técnica direta (IFD) e da indireta (IFI). PINI e col., em 1965¹⁴⁴, confirmaram a identidade do VLA por IFD, testando antissoros específicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína frente a seis cepas

diferentes, determinadas anteriormente por soroneutralização. RUCKERBAUER e col., em 1967¹⁵², utilizaram esta técnica para a detecção do VLA em rim de feto bovino e culturas de células inoculadas com tecidos e sangue de animais infectados experimentalmente.

A detecção de anticorpos através da IFI foi utilizada também por PINI e col., em 1968¹⁴⁸, para demonstrar a presença de anticorpos em soros de ovinos inoculados experimentalmente com o VLA. Estes autores concluíram ser este um teste com possibilidade de uso em levantamento sorológico, em triagem de soros para acompanhamento epidemiológico, bem como vários trabalhos de identificação viral têm sido realizados^{82.144.148.152}.

Desde então, tanto o método direto (IFD) como o indireto (IFI) vêm sendo extensivamente utilizados na detecção e distribuição do VLA em tecidos de animais infectados natural e experimentalmente^{25.55.82.144.147.152}, tecidos de embrião de galinha¹¹², tecidos de *Cullicoides variipennis*¹⁰⁰, identificação de amostras virais obtidas de isolamento^{39.105.147.152}, em menor escala no diagnóstico sorológico¹⁴⁸ e, mais recentemente, para analisar e localizar proteínas virais específicas com o uso de anticorpos policlonais e monoclonais (AcM)^{51.52.70.93}.

A reação de fixação do complemento, para demonstrar o complexo antígeno-anticorpo para o VLA, foi realizada, pela primeira vez, por VAN DEN ENDE e col., em

1954, conforme citação de HOWEL & VERWOERD, 1971⁸³. Preparações antigênicas de várias origens vêm sendo examinadas para esta finalidade. Os antígenos, preparados a partir de cérebros de camundongos (de 2 a 4 dias) infectados com o VLA, pela via intracerebral, extraídos pelo tratamento acetona-éter são, ainda, os mais utilizados, embora a obtenção a partir do sobrenadante de culturas celulares apresentem resultados satisfatórios^{24,35,105}.

BOULANGER e col., em 1975²⁴, desenvolveram um teste de fixação do complemento modificado (FCM), no qual se acrescentava uma fração de soro normal bovino, comprovadamente negativo para LA. Estes autores obtiveram, resultados comparáveis à IDGA, títulos 3 a 8 vezes superiores e detecção de anticorpos por um tempo muito mais longo em animais infectados naturalmente, em relação aos obtidos por FC convencional. PEARSON e col., em 1973¹⁴², também, utilizando esta técnica, obtiveram correlação direta entre a FCM e o isolamento do vírus, durante a viremia desenvolvida em bovinos inoculados experimentalmente, concluindo tratar-se de um bom teste de triagem para detecção de animais infectados pelo VLA.

A hemólise em gel foi descrita por JOCHIM & JONES, em 1980¹⁰⁴, com o objetivo de detectar e quantificar anticorpos contra o VLA, utilizando antígeno extraído a partir de material viral ligado à membrana celular de culturas de tecido infectadas pelo VLA. Esta técnica pode

apresentar algum valor na quantificação de anticorpos específicos para o VLA^{119.138.174}.

O ensaio imunoenzimático (EIE), para detecção de anticorpos anti-VLA, foi desenvolvido por MANNING & CHEN, em 1980, conforme citação de AFSHAR e col., 1987³. HUBSCHLE e col., em 1981³⁴, descreveram esta técnica utilizando antígeno purificado. Mais tarde, ANDERSON, em 1984¹⁰, relatou um método de EIE modificado, ao qual denominou EIE bloqueador, usando AcM produzidos e selecionados para reagir com o antígeno grupo-específico do VLA.

Após a descrição deste método, AFSHAR e col., em 1987^{3.4}, desenvolveram vários sistemas opcionais empregando o mesmo AcM; inicialmente, o EIE bloqueador³ e, em seguida, dois outros modelos: em um deles, usaram o papel de nitrocelulose como suporte e, no outro, adotaram um sistema de competição⁴. Esta mesma equipe realizou, em 1989⁵, estudos comparativos entre o EIE competitivo, o EIE indireto, e a IDGA, mostrando que o EIE competitivo apresenta melhores resultados em relação às outras técnicas. LUNT e col., em 1988¹²⁰, também desenvolveram um AcM grupo-específico para uso em sistema de bloqueio e ainda MECHAM e col., em 1990¹³², descreveram um EIE de captura utilizando anticorpos monoclonais e policlonais para detectar antígenos virais em vetores.

Entre as técnicas que detectam a especificidade de sorotipo encontram-se a neutralização, a

hemoaglutinação passiva e a inibição da hemoaglutinação 22.77.105.119.136.139.

A neutralização é a reação tradicionalmente utilizada para sorotipagem do VLA. As técnicas mais usadas são a soroneutralização em microplacas de poliestireno e o teste de redução/inibição de placas^{28.139.164.174}.

A hemoaglutinação passiva (HP) foi desenvolvida por BLUE e col., em 1974²². Mais tarde, VAN DER WALT, em 1980¹⁸⁸, trabalhando com a inibição da hemoaglutinação (IH), realizou estudos relativos ao grau de purificação de preparações antigênicas a serem utilizadas em HP e IH, demonstrando correlação entre estas duas reações e o teste de redução de placas, embora a IH apresentasse menor sensibilidade para a detecção de baixos níveis de anticorpos.

A especificidade de sorotipo destas três reações foi comprovada através de estudos com recombinantes gênicos dos sorotipos 10 e 11, realizados por KAHLOU e col., em 1983, conforme citação de COWLEY, 1987⁴¹ e 1989⁴², e 20 e 21⁴¹, onde foi demonstrada a associação da proteína codificada pelo segmento 2 do genoma viral (VP2) com a especificidade de neutralização e a hemoaglutinina, respectivamente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vírus: a cepa viral utilizada foi o VLA, sorotipo 4 (VLA-S4), cedido gentilmente pelo "National Animal Disease Center" (NADC), Ames-Iowa/EUA, através do Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) e do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA), Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasil.

2.2 Linhagens celulares: utilizaram-se as linhagens celulares BHK-21, clone 13 - derivada de rim de hamster recém-nascido, "Baby Hamster Kidney"¹²⁵ e VERO, proveniente de rim de macaco *Rhesus*. Culturas destas linhagens celulares foram preparadas na Central de Meios e Células do Laboratório Regional de Apoio Animal, LARA/Campinas, SP. O estoque de células, diluído em meio de cultura acrescido de 20% de soro fetal bovino e 10% de glicerina, foi mantido sob congelamento em nitrogênio líquido (N₂).

2.2.1 Manutenção das culturas celulares: as culturas foram submetidas a tratamento com tripsina a 0,25%, tamponada, para promover o desprendimento do tapete celular e individualização das células. O meio de crescimento foi descartado das garrafas (tipo "milk" ou "Roux"), e a monocamada lavada com tampão fosfato salina (TFS) para

retirada dos resíduos de soro, eventualmente existentes. Após a inativação da tripsina com meio Eagle, pH 6,8 contendo 20% de soro fetal bovino, uma alíquota de 1 ml foi retirada e adicionada de 1 ml de azul de trypan a 0,2%, para ser submetida à contagem de células viáveis, em câmara de Newbauer.

2.2.2 Preparação das garrafas de culturas celulares: as garrafas foram, então, semeadas com diluições variadas das suspensões iniciais de células, com base nas contagens realizadas previamente e de acordo com o tipo de frasco a ser usado, o tempo de permanência para crescimento e a linhagem celular.

2.2.2.1 Células BHK-21, clone 13: com esta linhagem, prepararam-se garrafas tipo "milk", "Roux" e rolantes, com volumes finais de 20 ml, 150 ml e 300 ml, respectivamente. O inóculo continha, aproximadamente, 200.000 células/ml, de modo a obter um tapete confluyente, entre 48 e 72 h de incubação, a 37°C, em estufa, sendo as garrafas rolantes colocadas em aparelho apropriado, com 6 ciclos de rotação por hora, onde permaneceram durante o período de incubação.

2.2.2.2 Células VERO: com esta linhagem, além das culturas em garrafas tipo "milk", "Roux" e rolantes, com o mesmo volume e submetidas às mesmas condições das células

BHK, prepararam-se, também, microplacas de poliestireno para titulação das "sementes" virais e laminulas para estudo da multiplicidade viral e para serem usadas como suporte nas provas de imunofluorescência indireta (IFI). O número de células foi aproximadamente 300.000 células/ml, como inóculo inicial.

2.2.3 Preparação das microplacas: as microplacas de poliestireno (marca Falcon), medindo 12,7 x 9,5 cm, com 96 cavidades, foram semeadas com 0,1 ml de suspensões de células VERO, contendo 300.000 células/ml, diluídas em meio Eagle adicionado de tampão HEPES 28 mM (N-2-hidroxietilpiperazina N-2-ácido etanossulfônico), em cada cavidade, de acordo com a citação de FERREIRA, 1974⁵⁷, acrescido de 10% de soro equino em substituição ao soro bovino, usado convencionalmente. Incubaram-se as placas sob atmosfera de 2,5% de CO₂ e umidade, durante 24 h, a 37°C, em estufa apropriada.

2.2.4 Preparação das células em laminulas: as laminulas, medindo 18 x 18 mm, em número de 6, montadas em placas de Petri de 90 x 15 mm, foram recobertas com 12 ml de suspensão de células VERO, contendo aproximadamente 300.000 células/ml, em meio e em condições atmosféricas semelhantes às utilizadas na semeadura das microplacas.

2.3 Meio de cultura: o meio utilizado foi o Eagle, na forma "Minimum Essential Medium" (MEM-Gibco), acrescido de vitaminas, caldo triptose-fosfato (CTF) e bicarbonato de sódio, a partir de soluções concentradas preparadas previamente e estocadas a - 20°C. Após a mistura nas proporções balanceadas, o pH do meio foi ajustado, por borbulhamento de CO₂, para 6,6 a 6,8, no meio destinado ao crescimento celular que foi acrescido de 10% de soro fetal bovino. Ajustou-se o pH da mesma forma para 7,4 a 7,6, no caso do meio destinado à manutenção das culturas infectadas pelo vírus. O meio foi esterilizado por filtração em filtros de membranas (Millipore - modelo 293), montados com pré-filtro (AP-25) e membranas de acetato de celulose (HAWP-45), com porosidade de 0,45 µm e membrana esterilizante (GSWP-22), com porosidade 0,22 µm e conservadas em câmara fria até o momento de uso, após terem sido feitos os testes de esterilidade.

2.4 Inoculação viral: a amostra viral, VLA-S4, foi inicialmente inoculada na linhagem BHK-21, clone 13, com o objetivo de adaptação e de preparação da "semente", para uso subsequente. O meio de crescimento celular foi removido da garrafa e a monocamada celular submetida a três lavagens com TFS 0,05 M, pH 7,6, antes da inoculação. Inocularam-se as garrafas tipo "milk", cultivadas com células, com 1 ml da amostra do VLA; a incubação foi feita a 37°C, durante 1 h,

para que ocorresse a adsorção do vírus às células. Após este tempo, o volume da garrafa foi completado para 10 ml com meio Eagle, sem soro, e permaneceu em incubação durante 96 h, com leitura diária em microscópio invertido (MI), para observação do efeito citopático (ECP). Após este tempo, o material sofreu 3 ciclos de congelamento-descongelamento e sonicação, durante 25 s, em banho sonicador (TEMPO ULTRASONIC T-9), sendo a seguir centrifugado a 600 g, durante 15 min, em centrífuga refrigerada International PR 6 (rotor 259), para separação dos restos celulares. Quando necessário, o pH do sobrenadante foi ajustado a 7,6, com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 7,5%. Submeteu-se o sobrenadante a mais duas passagens na mesma linhagem celular, em condições semelhantes às mencionadas anteriormente. A segunda passagem foi realizada em garrafas tipo "Roux", com inóculo viral de 10 ml e, a terceira, em garrafas tipo rolantes, com inóculo de 20 ml e volumes finais completados para 80 e 100 ml, respectivamente. As "sementes" virais, assim obtidas, foram divididas em alíquotas de 1 ml, congeladas e conservadas em N_2 líquido para após a titulação serem usadas nas etapas seguintes do trabalho.

2.4.1 Titulação da "semente" viral: a titulação foi feita em microplacas de poliestireno, cultivadas com células VERO, preparadas conforme descrito anteriormente, sendo consideradas adequadas para uso após um período de incubação

de 24 h, quando houvesse a confluência do tapete celular. Prepararam-se diluições da "semente" viral, de base 10, iniciando-se pela diluição 10^{-1} até 10^{-8} em meio Eagle modificado, sem soro, adicionado de 25 Unidades Internacionais (UI) de penicilina, 25 mg de estroptomicina e 25 mg de fungizon (marca Squibb), sendo colocado 0,1 ml de suspensão virulenta em cada cavidade, usando-se 8 cavidades por diluição, deixando-se 4 fileiras como controle de células, nas quais foram colocadas apenas o meio de cultura, no mesmo volume utilizado na manutenção das culturas infectadas. Após a colocação do inóculo viral, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 , nas condições referidas anteriormente. As leituras foram feitas diariamente, para acompanhamento do ECP e, a leitura final, em 96 h. Após transcorrido este tempo, as placas foram submersas em solução aquosa com 5% de formol e 0,1% de cristal violeta, para fixar e corar as células⁵⁷. O título da suspensão viral foi calculado pelo método de REED & MUENCH, 1938¹⁵⁰, e a dose infectante cultura de células 50% (DICC 50%) determinada pela recíproca da diluição viral que provocou 50% de ECP.

2.4.2 Inoculação das células preparadas em lâminulas: as células VERO, preparadas em lâminulas, foram inoculadas com VLA-S4, objetivando o acompanhamento da atividade citopática, consequente da multiplicidade viral e determinação do tempo ótimo de fixação das células para uso

em IFI. Quando o tapete celular se mostrou confluyente, em torno de 24 h, as células sofreram duas lavagens com TFS 0,05 M, pH 7,6, e foram infectadas com 0,1 ml da "semente" viral contendo $10^{4.8}$ DICC 50%/ml, por laminula. Uma hora após a inoculação, completou-se o volume da placa para 12 ml, com meio Eagle modificado, pH 7,6, sem soro e, em seguida, foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂. As mesmas foram acompanhadas por observação em microscópio invertido (MI) e coletadas às 0-12-24-48-72 h pós-infecção. Após sofrerem duas lavagens de 5 min, com TFS, foram divididas em dois grupos. As que se destinavam ao acompanhamento da multiplicidade viral foram imersas em fixador de Bouin, durante 15 min, transferidas para álcool 70°GL, deixadas a 4°C, sendo posteriormente coradas com Giemsa a 1/10 em tampão de Sorensen durante 45 min, lavadas com o mesmo tampão, secas a 37°C, mergulhadas em xilol e montadas sobre lâminas com bálsamo do Canadá⁵². A leitura foi realizada em microscópio comum binocular (marca Zeiss), em aumento de 160 e 640 vezes. As células infectadas que se destinavam a IFI foram fixadas sequencialmente com metanol e acetona, durante 15 min cada uma, a -20°C, sendo novamente lavadas duas vezes com TFS, durante 5 min, secas ao ar e conservadas a -20°C até o momento de uso⁵⁴.

2.4.3 Preparação das suspensões virais: as suspensões virais foram preparadas nas células VERO cultivadas em garrafas tipo rolantes, seguindo-se o procedimento

semelhante ao descrito anteriormente para preparação da "semente" viral. A inoculação foi feita com 20 ml da "semente" viral preparada e titulada previamente, contendo $10^{4.6}$ DICC 50%/ml. As garrafas, com volume final de 100 ml, foram colocadas em aparelho rolante nas condições referidas anteriormente. O ECP, acompanhado diariamente, foi considerado satisfatório quando ocorreu em um porcentual de 80% ou mais, em aproximadamente 72 e 96 h após a inoculação do VLA. O descolamento do tapete celular foi facilitado por agitação manual vigorosa, sendo o conteúdo das garrafas misturado e, posteriormente, centrifugado a 1.400 g, durante 15 min, em centrífuga refrigerada International PR 6 (rotor 259), para separação dos componentes celulares e do sobrenadante, sendo o pH do mesmo ajustado a 7,6, com NaHCO_3 a 7,5%¹⁴⁸. Os componentes celulares infectados e o sobrenadante foram destinados a preparações distintas, quais sejam: purificação viral e produção do antígeno solúvel.

2.5 Purificação viral: as partículas virais foram separadas a partir das células infectadas e de sedimento obtido por ultracentrifugação a 100.000 g, durante 1 h, em ultracentrifuga Beckman (rotor 35). Este sedimento foi ressuspenso em tampão tris-hidroximetilaminometano 100 mM, acrescido de 1,5 mM de CaCl_2 , ajustado com solução de ácido clorídrico 6N (Tris/HCl-Ca^{+2}), pH 7,2 e submetido a tratamento com igual volume de Freon 113 (V/V), sob agitação

em "mixer" Vortex, conforme técnica descrita para rotavírus (H.G.PEREIRA, 1988 - comunicação pessoal). Após centrifugação a 2.000 g, durante 10 min, em centrífuga refrigerada Beckman (rotor JA-14), a fase aquosa foi colocado sobre um "colchão" de sacarose a 45%, no mesmo tampão de eluição em tubos de 5 ml, sendo em seguida ultracentrifugado a 100.000 g, durante 1 h. O sedimento foi ressuspenso em uma quantidade mínima do tampão usado anteriormente. O material foi, então, colocado em um tubo contendo 4,8 ml de cloreto de cézio (CsCl), preparado em Tris/HCl-Ca⁺², com densidade final ajustada para 1,375 g/cm³, sendo então ultracentrifugado a 100.000 g, durante 18 h. As frações de 0,5 ml foram coletadas por perfuração dos tubos e dialisadas em tampão Tris/HCl-Ca⁺² por 2 h. As frações selecionadas (3-4-5), através dos valores individuais de densidade e da análise do RNA e das proteínas, de cada uma delas, foram misturadas e centrifugadas a 2.000 g, durante 10 min; em seguida, o sobrenadante límpido foi também submetido à ultracentrifugação em CsCl, conforme já descrito. Coletaram-se novas frações e a densidade de cada uma delas foi determinada por pesagem de uma alíquota de 100 µl de cada fração em balança com sensibilidade de 0,1 mg e calculada com base na razão entre o peso da mesma e o respectivo volume. Os valores obtidos foram colocados em gráfico, no qual a abcissa representa a ordem de coleta das frações (da base - F1 - para o ápice do tubo - F9) e, a ordenada, a

densidade correspondente. As frações 5 e 6, resultantes da segunda ultracentrifugação em CsCl, foram misturadas e sua absorbância medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260-280 nm (região de luz ultravioleta (UV)). A partir deste material, realizaram-se observações em microscópio eletrônico (ME), e estudou-se o ARN e a proteína, através de EGPA.

2.5.1 Microscopia eletrônica: as partículas virais purificadas, foram visualizadas utilizando-se o método descrito por BARTH, 1985¹⁸, com grades recém-revestidas de formvar e carbono, tratadas com polilisina (poli-L-lisina) a 0,1% diluída em água destilada, pH 7,2, durante 30 s. A suspensão viral foi então colocada sobre as grades, pelo mesmo período, sendo o excesso retirado com papel absorvente e lavagens sucessivas com água destilada¹⁷. Em seguida, foi colocado ácido fosfotúngstico (AFT) a 2%, com tratamento instantâneo (AFT rápido) ou tratamento durante 30 s. As preparações foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (EM 10B Carl Zeiss Oberkoclun), em aumentos de 131.000, 142.000 e 309.000 x, no Centro de Microscopia Eletrônica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.

2.5.1.1 Determinação do diâmetro das partículas: o diâmetro das partículas virais observadas em ME, conforme descrito previamente, foi determinado pela medida das mesmas

em fotos (aumentos de 131.000 e 142.000) com o auxílio de paquímetro (mm), sendo os valores convertidos a nm. O diâmetro destas partículas foi então calculado pela razão entre as medidas e o respectivo aumento. Os valores obtidos foram colocados em uma tabela de distribuição de frequência, e analisados estatisticamente através da determinação do intervalo de confiança a 95% para cálculo do diâmetro médio populacional das partículas.

2.5.2 Análise do ARN: o estudo do ARN do VLA-S4 foi feito pelo método de separação eletroforética em gel de poliacrilamida (EGPA), pelo sistema LAEMMLI, 1970¹¹⁰. Como padrão, utilizou-se o ARN da amostra SA-11 do rotavírus, com base na média dos valores fornecidos por BOTH e col., 1982²³ e ESTES & COHEN, 1989⁵⁶.

2.5.2.1 Extração do ARN: a extração foi obtida pelo tratamento de aproximadamente 400 µl do lisado celular e do sobrenadante com 40 µl de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10%, em água destilada e, após uma ligeira agitação, incubados a 37°C, durante 30 min. Acrescentaram-se 400 µl de uma mistura de partes iguais de clorofórmio e fenol redestilado e saturado em água. O material foi submetido a agitação em "mixer"/Vortex durante 10 min à temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugado a 3.500 g, durante 10 min, em centrífuga refrigerada Beckman J2-21 (rotor JA-14). Coletou-se a fase aquosa e, na maioria dos casos, houve

a necessidade de diluir a inter-fase com TFS pH 7,6 e repetir o tratamento com o fenol-clorofórmio, nas condições usadas anteriormente, fazendo-se uma mistura das fases aquosas obtidas nas duas extrações, para a continuidade do processo. O ARN foi então precipitado mediante a adição de 40 μ l de NaCl a 20% e 1 ml de álcool etílico absoluto. Misturou-se levemente o conteúdo dos tubos e colocou-se a -20°C, durante 18 h, sendo novamente centrifugado a 3.500 g, durante 10 min, para que ocorresse a sedimentação do mesmo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dessecado a vácuo. Em cada tubo foram colocados 20 μ l de mistura dissociante, constituída de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, uréia 5 M, 5% de 2-mercaptoetanol, 3% de DSS e 0,01% de azul de bromofenol, sendo os mesmos incubados a 56°C, durante 10 a 15 min⁷⁸. Volumes de 5 μ l das frações purificadas foram tratados diretamente com a mistura dissociante, na mesma proporção e tratamentos indicados para o ARN extraído e precipitado, isto é, 56°C, durante 10 a 15 min.

2.5.2.2 Preparação do gel: o gel foi preparado de acordo com a técnica descrita por HERRING e col., 1982⁷⁸, em placas de vidro com dimensões de 9,5 x 9,5 cm, constituindo-se de um gel separador a 7,5% de acrilamida, partindo de uma solução a 30% de acrilamida e 0,8% por peso de N,N' bis-metileno-acrilamida em Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, sobreposto por um gel concentrador de 3% de acrilamida, contendo Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, onde são feitas as canaletas para

colocação das amostras, sendo polimerizados quimicamente pela adição de 0,025% por volume de tetrametil-etileno diamino (TEMED) e persulfato de amônio 0,05% (p/v). O tampão usado na corrida eletroforética contém Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e DSS a 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada nas seguintes condições: corrente elétrica de 20 a 25 mA de intensidade e 80 a 100 V, durante 1 h e 45 min, à temperatura ambiente.

2.5.2.3 Coloração do gel: o gel foi corado pela reação de íons prata, baseado no método SAMMONS modificado, conforme citação de HERRING e col., 1982⁷⁸, por fixação com 200 ml de solução de etanol e 0,5% de ácido acético sob agitação leve, durante 45 min, sendo então submerso em solução de nitrato de prata 0,11 M, sob agitação, durante 30 min. A prata foi removida das duas faces do gel por uma leve lavagem com água destilada, e a revelação realizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,75 M, contendo 1,9 ml de formaldeído em 250 ml de água destilada. O aparecimento das bandas ocorreu em 10 a 15 min, momento em que a reação foi interrompida pela transferência de gel para ácido acético a 5%.

2.5.3 Análise das proteínas: o estudo das proteínas do VLA-S4 foi feito pela análise das frações obtidas na purificação do vírus, através de EGPA, seguindo-se o sistema LAEMMLI¹¹⁰. Como marcadores, foram usadas as proteínas alfa-

lactoalbumina (PM 14.200), tripsina de soja (PM 24.000), anidrase carbônica de eritrócito bovino (PM 29.000), desidrogenase 3-fosfato, de músculo de coelho (PM 36.000), ovoalbumina (PM 45.000), albumina bovina (PM 66.000), fosforilase B (PM 97.400), galactosidase de *E. coli* (PM 116.000) e miosina de músculo de coelho (PM 205.000).

2.5.3.1 Preparação das amostras: um volume de 15 μ l de cada uma das frações obtidas na purificação viral, em CsCl, foi tratado diretamente com 20 μ l do tampão de amostra, 2 vezes concentrado, contendo Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, 10% de 2-mercaptoetanol, 20% de glicerina, 4,6% de DSS e 0,02% de azul de bromofenol, submetidas à fervura (100°C), durante 1 min.

2.5.3.2 Montagem do gel: o gel foi montado nas mesmas dimensões que o gel preparado para ARN, constituído de um gel separador a 12% de acrilamida, contendo 0,30% de N,N' bis-metileno acrilamida e Tris-HCl 0,375 M, pH 8,7, polimerizado quimicamente com 0,33% de persulfato de amônio e 0,033% de TEMED, sobreposto por um gel concentrador a 3% de acrilamida com 0,10% de N,N' bis-metileno acrilamida e de Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, polimerizado quimicamente pela adição de persulfato de amônio 0,05% e TEMED 0,05%, onde são feitas as canaletas para aplicação das amostras. O tampão usado na corrida eletroforética apresentou a mesma composição do utilizado para o estudo do ARN, sendo a mesma

realizada sob amperagem de 20 a 25 mA, 100 V, à temperatura ambiente, até que se deu a saída total do corante.

2.5.3.3 Coloração do gel: o gel foi corado com azul de "coomasie" a 0,25%, em solução de metanol a 5% e ácido acético a 10%, durante 2 h, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, o mesmo foi submetido à descoloração com solução contendo 50% de metanol comercial e 10% de ácido acético glacial, até que foi possível a evidenciação das bandas de proteína.

2.5.4 Determinação do peso molecular (PM): o PM dos segmentos do ARN e das proteínas virais foi determinado com base na mobilidade eletroforética de cada um deles em EGPA. Determinou-se o PM dos materiais referidos através da equação de regressão linear, determinada pela relação entre a mobilidade relativa e o logaritmo do PM dos padrões utilizados em cada gel, conforme citação de BARRADAS, 1983¹⁸.

2.6 Produção e padronização do antígeno solúvel (AS): o AS foi preparado a partir do sobrenadante de culturas de células VERO infectadas com VLA-S4, de acordo com técnica descrita no protocolo de serviço do NADC, 1985¹⁴⁸. Este sobrenadante, em geral em torno de 6 l, foi submetido a filtração clarificante em filtros de membranas (Millipore -

Mod.142), montado com pré-filtro (AP-25) e membranas de acetato de celulose com porosidade de 8 μ m; seguido de filtração tangencial pulsante em filtro cassete (Millipore), usando membrana "Pellicon" com capacidade nominativa limitante (CNL) de PM=10.000. Em seguida, este material foi concentrado pelo sistema de ultrafiltração (Millipore), utilizando-se membrana "Pellicon" com CNL de PM=25.000. O material resultante foi centrifugado a 100.000 g, durante 1 h, em ultracentrífuga Beckman, rotor-35, sendo por último filtrado em filtros Swinnex (Millipore), de 45 mm de diâmetro, com membranas de acetato de celulose, com porosidade progressivamente menores (1,2 μ m; 0,8 μ m e 0,45 μ m) e tratado com azida sódica 0,01%. Posteriormente, o AS foi dividido em alíquotas de 1 ml e conservado a 4°C. A padronização do AS foi feita pela reação de imunodifusão em gel de agar, técnica para a qual o mesmo era destinado¹⁰³. Foi analisado o perfil protéico e realizado o teste de identidade; a especificidade da proteína e a avaliação semi-quantitativa, em comparação com os antígenos produzidos pelo NADC e pela "Veterinary Diagnostic Technology, Inc." (antígeno comercial), adquiridos pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA), através do IICA.

2.6.1 Teste de identidade: a técnica empregada para o teste de identidade foi a imunodifusão radial dupla em gel de agar (IDGA), introduzida por OUCHTERLONY, conforme

citação de BIER e col., 1982²⁰ e TIZARD, 1985¹⁸⁸, usando-se agar a 1% em tampão Veronal, pH 7,6, sobre lâminas de vidro (7 x 3 cm). O gel foi perfurado com molde apropriado, de modo a obter, após sucção, cavidades com diâmetro de 4 mm, sendo uma central e seis ao redor, equidistantes entre si. Foi usado soro anti-VLA como controle positivo (SCP), colocado na cavidade central e os antígenos padrões (NADC e comercial) colocados nas cavidades periféricas, alternadamente com o AS¹⁰³. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente, em câmara úmida, durante 48 h; em seguida, processou-se a leitura final, pela observação visual das bandas ou linhas de precipitação e interpretação baseada nas reações de identidade total, parcial e não-identidade^{20,103,188}.

2.6.2 Perfil protéico do AS: o perfil protéico do AS foi obtido através de EGPA, executado de modo semelhante ao do estudo das partículas virais (item 2.5.3), em comparação com os antígenos do NADC e o comercial.

2.6.3 Especificidade da proteína: a especificidade da proteína contida no AS, que participa diretamente da reação de imunodifusão em gel de agar, foi avaliada de acordo com técnica descrita por ADAMS e col., 1985¹. A porção do gel contendo a banda de precipitação, formada pelo AS e soros de ovinos e bovinos reagentes para o VLA, foi retirada da lâmina e sofreu várias lavagens com TFS, durante 48 h, para

remover as proteínas não-precipitadas. O agar retirado foi fundido; a seguir, foi seco a vácuo e o material resultante foi tratado com tampão de amostra, de modo idêntico ao usado para as proteínas virais, para ser testado por EGPA. O PM desta proteína foi calculado com base na média dos resultados obtidos do perfil proteico e da especificidade, onde foram utilizados, como padrões de PM, a albumina bovina (PM 66.000) e cadeia pesada H (PM 55.000) e cadeia leve L (PM 25.000) de imunoglobulina G bovina, de modo semelhante ao empregado para os segmentos do ARN e das proteínas virais.

2.6.4 Avaliação semi-quantitativa:

2.6.4.1 Imunodifusão radial simples: realizada de acordo com técnica descrita por MANCINI, conforme citação de BIER e col., 1982²⁰ e TIZARD, 1985¹⁸⁸, incorporando-se o antissoro específico na diluição final de 1/2, em gel de agarose em concentração final de 1%. Os antígenos, diluídos em base 2, até a diluição 1/8, foram colocados em cavidades de 4 mm de diâmetro, escavadas no gel. O material permaneceu em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 5 dias, quando se fez a interpretação da prova, de acordo com formação de anéis ou halos de precipitação. Com base no diâmetro dos halos de precipitação formados, foi traçada a curva de titulação, onde se projetou, na abcissa, as

diluições dos antígenos e, na ordenada, a medida dos respectivos halos de precipitação.

2.6.4.2 Titulação em bloco: este teste seguiu o mesmo sistema do teste de identidade, sendo o antígeno, em diluições de base 2, começando de 1/1 a 1/8, colocado na cavidade central frente às diluições do SCP, também em base 2, 1/1 a 1/32, no sentido horário. As lâminas foram deixadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, e a leitura final foi realizada 48 h após a distribuição do material.

2.7 Testes sorológicos: na presente pesquisa foram padronizadas as técnicas de imunodifusão em gel de agar e imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-VLA.

2.7.1 Soros de campo: realizaram-se os testes sorológicos com 190 soros de bovinos, procedentes da região de Campinas, Estado de São Paulo, e 72 de ovinos procedentes de diferentes regiões, pertencentes a propriedades com ou sem histórico de doença abortiva.

2.7.2 Imunodifusão em gel de agar (IDGA)

2.7.2.1 Reativos usados na IDGA

Antígeno : foi usada a preparação solúvel (AS), produzida e padronizada conforme descrito anteriormente.

Soros-controle positivos (SCP): utilizaram-se o SCP de origem bovina (cedido pelo NADC), o soro positivo que acompanha o antígeno comercial; soros de campo com diferentes níveis de anticorpos e soros de dois ovinos inoculados experimentalmente. Estes ovinos, que apresentavam sorologia negativa para LA, por IDGA, foram colocados em condições de isolamento, inoculados com $10^{4.5}$ DICC 50% /ml, por via subcutânea e sangrados a intervalos de três a quatro dias após a inoculação.

Soros-controle negativos (SCN): utilizaram-se os soros de bovinos de animais provenientes do Canadá, de área comprovadamente livre da doença e submetidos a testes prévio no país de origem e na chegada ao Brasil.

2.7.2.2 Realização do teste de IDGA: realizou-se a prova de acordo com a descrição de JOCHIM & PEARSON, 1979¹⁰³, em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 16 ml de agar Noble, a 1% em tampão Veronal, pH 7,6, onde foram feitas escavações com molde apropriado, sendo uma central e seis ao redor, equidistantes entre si, conforme mencionado anteriormente. Na cavidade central, colocou-se o antígeno, e em dois orifícios equidistantes, o soro controle positivo e, nos restantes, os soros em exame. As placas permaneceram em incubação, em câmara úmida e temperatura ambiente, durante 48 h, após este tempo, procedeu-se a leitura final. A banda ou linha de precipitação formada entre o antígeno e o soro-controle positivo foi a referência

para a leitura do teste, podendo-se observar reações negativas, fracamente positivas e positivas^{44.103.143}.

2.7.3 Imunofluorescência indireta: a imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada conforme técnica descrita por JENNINGS & BOORMAN, 1980¹⁰⁰, usando lamínulas com células VERO infectadas com VLA-S4, conforme mencionado anteriormente, frente a soros de animais de campo e conjugado anti-IgG bovina e ovina marcado com isotiocianato de fluoresceína (ITCF).

2.7.3.1 Purificação das imunoglobulinas de bovino: foi iniciada a partir de 100 ml de soro total coletado de dois bovinos jovens e aparentemente em bom estado de saúde. O soro foi precipitado com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), em um grau de saturação final de 40%, por três vezes, sendo em cada uma delas colocado sob agitação constante, a 4°C, durante 2 h. Decorrido este tempo, foi centrifugado a 1.600 g, durante 15 min, em centrífuga refrigerada Beckman J2-21 (rotor JA-14). O sedimento foi ressuspenso em 60 e 40 ml de salina fisiológica, nas duas primeiras centrifugações, respectivamente, sendo ao final solubilizado em volume de aproximadamente 20 ml de TFS. Este material foi submetido a diálise em salina fisiológica pH 8,0, até demonstrar ausência de ions sulfato no líquido de lavagem, pelo teste com o reativo de Nessler, de acordo com protocolo do NADC, 1985¹⁴⁹. A amostra foi submetida à centrifugação para

retirada de substâncias insolúveis, sendo 4 ml da mesma cromatografado em coluna de Sephadex G-200, equilibrada e eluída com TFS 0,05 M, pH 8,0. As dimensões da coluna eram de 90 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro, com volume total de 441,78 ml³⁰. Amostras de 3 ml foram obtidas em coletor automático de frações (marca LKS) e submetidas à leitura em espectrofotômetro UV, em um comprimento de onda de 280 nm. As leituras obtidas foram colocadas em um gráfico e as frações protéicas testadas por imunoeletroforese. Aquelas contendo imunoglobulinas da classe G (IgG) foram misturadas, liofilizadas, ressuspensas em 1/5 do volume original e usadas para produção de soro hiperimune anti IgG bovina, sendo a concentração protéica calculada pelo método do biureto¹¹³.

2.7.3.2 Produção de soros anti-soro total e anti-IgG bovina e ovina: prepararam-se soros hiperimunes anti-soro total bovino e ovino e anti-IgG bovina, purificadas conforme descrito anteriormente, e ovina (Sigma). Os antissoros foram produzidos em coelhos adultos jovens, hígidos, seguindo o mesmo procedimento. Foram inoculados, aproximadamente, 40 mg de proteína distribuídos em quatro inoculações, a intervalos semanais, por via intra-dérmica, com 0,1 ml por ponto de inoculação. A primeira inoculação foi feita com o material emulsificado em adjuvante completo de Freund e, as subseqüentes, em adjuvante incompleto de Freund. Realizou-se a sangria 7 dias após a última

inoculação, e o soro obtido foi conservado a -20°C , até a realização do controle de especificidade (R.RANGER & G.M.BROWN, 1987 - protocolo interno do NADC).

2.7.3.3 Controle de especificidade dos antissoros:

a imunoeletroforese, técnica idealizada por GRABAR & WILLIAMS, conforme citação de BIER e col., 1982²⁰ e TIZARD, 1985¹⁸⁸, foi realizada em gel de agar a 1% em tampão Veronal-acetato de sódio 0,01 M, pH 8,6, (Difco). Os antígenos, soro total bovino ou ovino, frações protéicas obtidas em Sephadex G-200 e IgG ovina (Sigma), foram colocados em cavidades feitas no gel e submetidas a uma corrente elétrica de 6 mA/cm de gel, 100 V, durante aproximadamente 3 h. Após este tempo, foram cortadas canaletas laterais e colocados os antissoros totais e os anti-IgG das duas espécies animais. As lâminas foram deixadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante um período de 24 a 48 h, quando se procedeu a leitura final.

2.7.3.4 Purificação dos antissoros:

uma alíquota de 10 ml de cada um dos antissoros (anti IgG bovina e ovina) foi clarificada por centrifugação a 1.400 g, durante 10 min, em centrífuga refrigerada International PR 6 (rotor 259). Igual volume de solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi adicionado, vagarosamente, ao soro dos coelhos, sendo levados, então, à geladeira, sob agitação, durante 20 min. Após centrifugação a 1.800 g, durante 15 min, o sedimento

foi lavado em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50%, e novamente centrifugado à mesma velocidade, sendo o precipitado ressuspenso em 4 ml de TFS, dialisado contra o mesmo tampão e centrifugado a 1.400 g, nas condições mencionadas anteriormente (C.ROMERO, 1987 - Protocolo interno do Centro Nacional de Suínos e Aves, Concórdia/SC). Este material foi cromatografado em coluna de DEAE-Sephadex A-50, medindo 32 x 1,2 cm, eluída e equilibrada em TFS, pH 6,6^{ss}. As frações foram coletadas e submetidas a processamento semelhante ao seguido para as frações obtidas em Sephadex G-200, sendo as IgG de coelhos anti-IgG de bovino ou de ovino utilizadas para preparação dos conjugados para IFI.

2.7.3.5 Marcação das IgG de coelhos com isotiocianato de fluoresceína (ITCF): o conteúdo protéico de cada uma das preparações (IgG de coelho anti-IgG bovina e ovina) foi ajustado para 20 mg de proteína/ml, sendo as mesmas alcalinizadas com tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,5 e imediatamente dialisadas em banho de TFS, adicionado do mesmo tampão contendo 0,20 mg/ml de ITCF (Sigma), em um volume de 10 vezes o volume de proteínas a ser dialisado, conforme indicação do NADC, 1985^{14B}. O material foi mantido em diálise, sob agitação lenta, a 4°C, durante 18 h e, posteriormente, à temperatura ambiente por 2 h. Após este tempo, foi colocado em banho de TFS, pH 7,6 gelado, em repouso por 2 h, e lavados exaustivamente no mesmo tampão a 4°C, sob agitação. O excesso de fluorocromo livre foi

retirado em coluna de Sephadex G-25, medindo 32 x 1,2 cm, equilibrada e eluída com TFS, pH 7,6¹¹³. Os conjugados anti-IgG bovina e ovina assim obtidos, foram divididos em alíquotas de 0,4 ml e estocados a -70°C, para uso subsequente.

2.7.3.6 Titulação dos conjugados para IFI: os títulos dos conjugados anti-IgG bovina e ovina foram determinados por titulação em bloco. Células infectadas, fixadas em lâminulas com metanol e acetona, foram recobertas com 25 µl de soros bovino e ovino positivos e negativos para VLA, nas diluições 1/10, 1/20 e 1/40 em TFS, incubadas a 37°C, durante 45 min e submetidas a três lavagens de 5 min com TFS gelado. Em seguida, as lâminulas foram recobertas pelas diluições 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60 e 1/80 do respectivo conjugado, anti-IgG bovina ou ovina, marcado. Após a incubação a 37°C, durante 45 min, foram realizadas três lavagens de 5 min, com TFS, e a montagem feita em lâmina com glicerina tamponada (pH 7,5) e leitura em microscópio de fluorescência Zeiss, com sistema de epi-iluminação.

2.7.3.7 Realização da IFI: todos os soros de campo e dos ovinos inoculados experimentalmente foram estudados nas diluições 1/5 e 1/10 em TFS, pH 7,6. As células infectadas, fixadas conforme descrito anteriormente foram incubadas com 25 µl das diluições de soro a 37°C, durante

45 min e lavadas três vezes com TFS, a 5 min de intervalo. As preparações foram, então, incubadas com conjugado, anti-IgG bovina ou anti-IgG ovina, diluídos em TFS, a 37°C, durante 45 min, antes das três lavagens de 5 min, com o mesmo tampão. As laminulas foram montadas em glicerina tamponada e examinadas em microscópio de fluorescência.

2.7.4 Análise estatística: com os resultados da pesquisa de anticorpos anti-VLA pelas técnicas de IDGA e IFI, foram calculadas a sensibilidade (S), a especificidade (E), os valores preditivos positivo (VPR+) e negativo (VPR-). Foi também avaliada a concordância (C) e aplicado o teste de associação de Yule, ao nível de rejeição de alfa = 0,05 ($\chi^2_E = 3,84$), segundo BERQUÓ e col., 1981¹⁹, para verificar a associação entre as duas técnicas. O procedimento estatístico baseou-se na estimativa por intervalo das verdadeiras proporções de S, E, VPR+ e VPR- para limites de confiança iguais a 95%²⁰. Na determinação do Coeficiente de Yule para verificar o grau de associação entre as provas de IFI e IDGA, para soros de bovinos e ovinos, e no Teste "Z" para duas proporções com aproximação normal para constatar a possível existência de diferenças entre os resultados obtidos em bovinos e ovinos, considerando os diferentes parâmetros de validação da prova de IFI²⁰. Adotou-se, como nível de rejeição alfa, 0,05 e, o valor crítico de "Z" de alfa, 1,96.

3 RESULTADOS

3.1 Cultura de células

As células BHK-21, clone 13, apresentaram metabolismo celular acelerado e as células VERO, comparativamente às da linhagem BHK, mostraram menor grau de crescimento, sendo necessário um maior número de células para a obtenção de um tapete celular confluyente, em um mesmo período de 48 e 72 h, parâmetro que serviu de base para as sementeiras subsequentes.

3.2 Adaptação da cepa viral

A adaptação da cepa do VLA-S4 ocorreu após duas passagens na linhagem BHK-21, clone 13. Na primeira passagem, não houve alteração perceptível ao MI, durante um período de aproximadamente 96 h. Na segunda passagem observou-se o início do ECP, com arredondamento celular característico e descolamento da monocamada, em torno de 72 a 96 h. Considerou-se, neste momento, que a cepa viral estava adaptada às condições do laboratório.

Procedeu-se a mais uma passagem nesta mesma linhagem celular, em garrafas tipo rolantes, constatando-se que o ECP tornou-se evidente e o descolamento celular também se deu em 72 a 96 h.

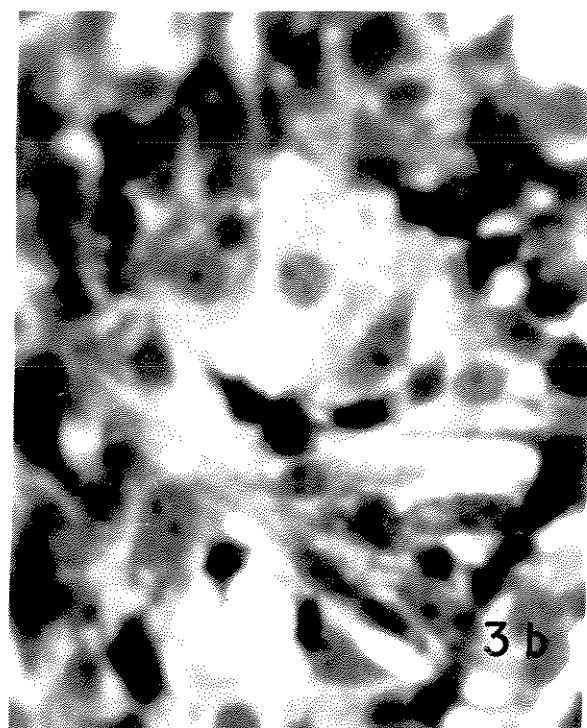
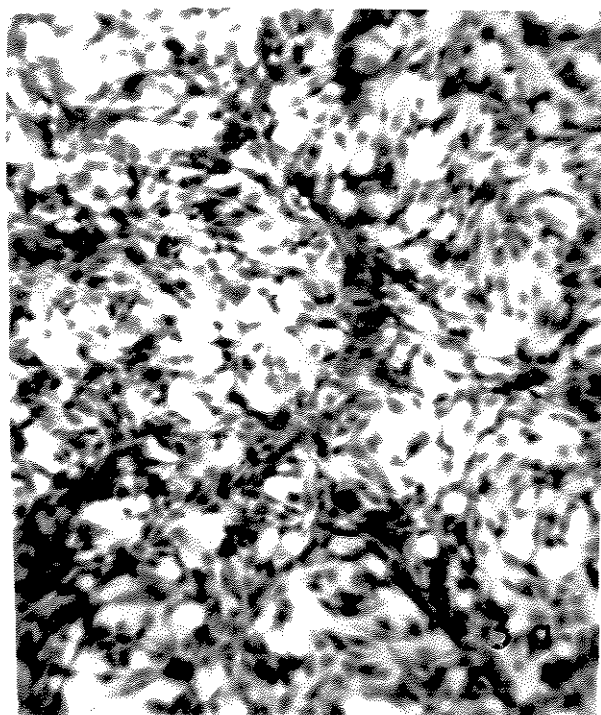
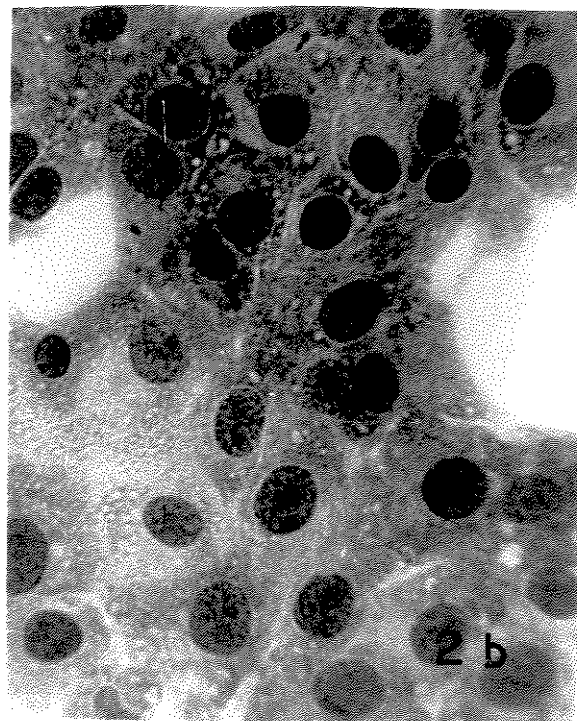
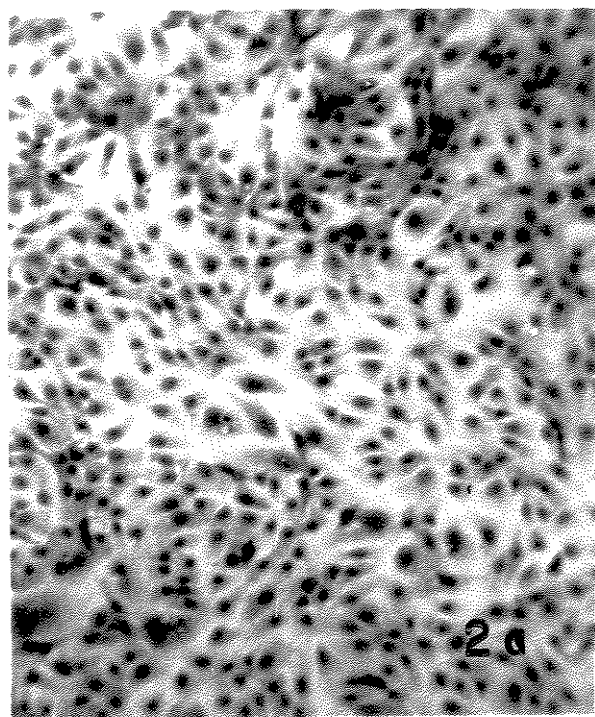
3.2.1 Títulos infecciosos

As "sementes" virais apresentaram títulos infecciosos que variaram de $10^{3.8}$ a $10^{5.8}$ DICC 50% /ml, em células VERO, preparadas em microplacas de poliestireno.

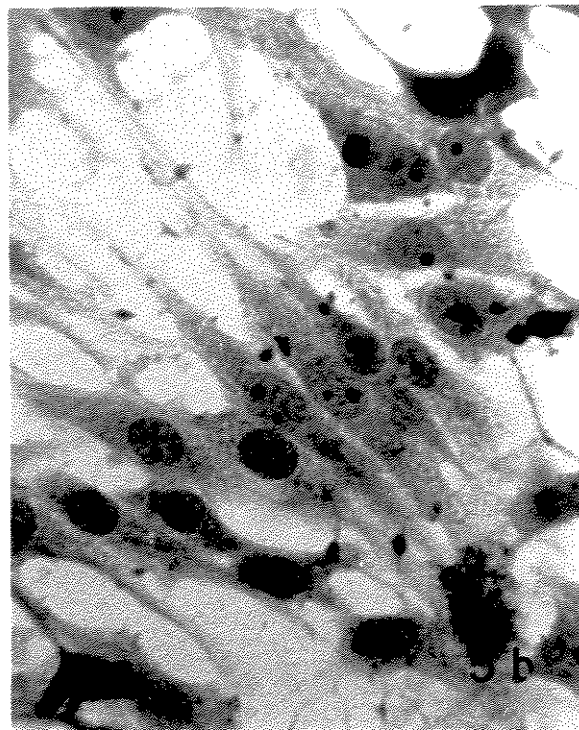
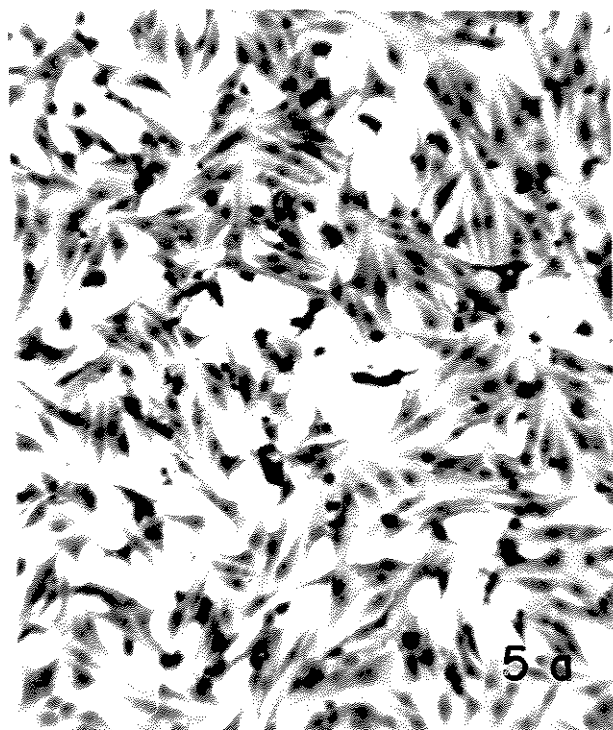
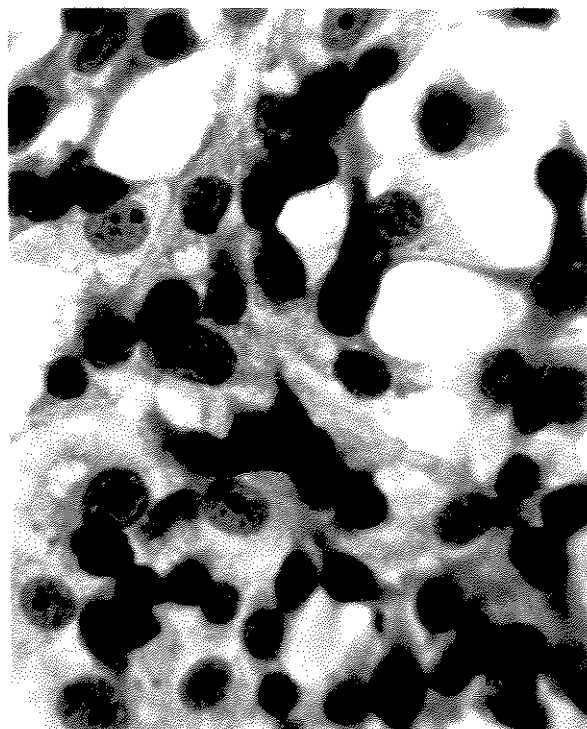
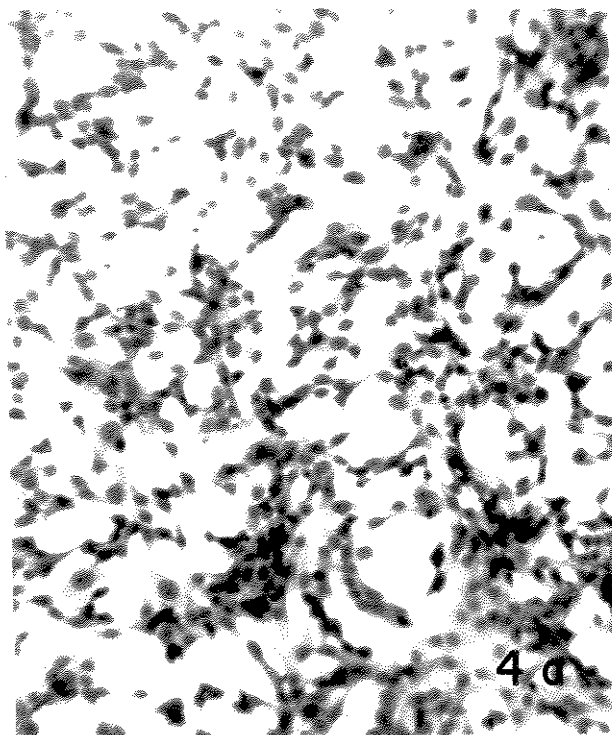
3.2.2 Efeito citopático

A multiplicidade viral foi observada pelo acompanhamento do efeito citopático. As figuras 2 a 5 mostram células VERO não-infectadas e infectadas, após 24, 48 e 72 h, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa.

As células não-infectadas estão distribuídas em monocamada relativamente homogênea e mostram aspecto típico de células epiteliais, núcleo proeminente, nucléolo visível e algumas apresentam pequenos vacúolos (Figuras 2a e 2b), compatível com a linhagem. Após 24 h de infecção, as células sofreram um leve processo de retração e arredondamento, surgindo agrupamentos celulares que levaram à formação de espaços entre as mesmas (Figuras 3a e 3b), processo este que foi mais acentuado às 48 h pós-infecção, quando houve um nítido aumento da vacuolização citoplasmática e do volume do núcleo celular (Figuras 4a e 4b). Com o avanço da infecção viral, o efeito citopático se estende a todo o tapete celular e, às 72 h, observam-se predominantemente núcleos soltos e picnóticos, cordões citoplasmáticos finos, e células com aspecto fusiforme e estrelado, e destruição citoplasmática que culmina com a morte celular (Figuras 5a e 5b).



FIGURAS 2-3: Células VERO fixadas em Bouin e coradas com corante de Giemsa.
FIGURAS 2a, 2b: Células não-infectadas, aumentos de 160 e 640 x, respectivamente
FIGURAS 3a, 3b: Efeito citopático provocado pelo VLA-S4 em células VERO, após 24 h de infecção viral, aumentos de 160 e 640 x, respectivamente.



FIGURAS 4-5: Células VERO fixadas em Bouin e coradas com corante de Giemsa.

FIGURAS 4a, 4b: Efeito citopático provocado pelo VLA-S4 em células VERO, após 48 h de infecção viral, aumentos de 160 e 640 x, respectivamente.

FIGURAS 5a, 5b: Efeito citopático provocado pelo VLA-S4 em células VERO, após 72 h de infecção viral, aumentos de 160 e 640 x, respectivamente.

3.2.3 Suspensões virulentas

As suspensões virulentas preparadas em células VERO, conforme descrito no item 2.4.3., apresentaram rendimento satisfatório e os seus títulos variaram entre $10^{3.4}$ e $10^{5.6}$ DICC50% /ml.

3.3 Purificação viral

Na primeira ultracentrifugação em CsCl, formou-se uma larga faixa no centro do tubo, de aspecto turvo, contendo o material viral e, ainda, componentes celulares, demonstrados através do cálculo de densidade e análise de ARN e proteínas de cada uma das frações. Esta faixa turva correspondia às frações 3, 4 e 5. Após a centrifugação do material desta região e uma segunda ultracentrifugação em CsCl, obteve-se uma banda fina, aproximadamente na região média do tubo, onde foi demonstrada a presença de partículas virais através de ME e eletroforese das frações individuais. Tal banda, equivalente às frações 5 e 6, avaliada através de espectrofotometria UV, mostrou absorbância de 0,987 e 1,291, a 260 e 280 nm, respectivamente, que correspondem a um rendimento de 0,24 mg de proteínas/ml.

Pelo cálculo da densidade das frações, e por comparação com o valor de densidade do VLA ($1,36 - 1,39$ g/cm³), citado na literatura^{34.83.170.172}, pôde-se associar

a presença do vírus às frações 3-4-5, na 1ª. ultracentrifugação (densidades 1,407; 1,368; 1,321, respectivamente), e às frações 5-6, na 2ª. ultracentrifugação (densidades 1,384; 1,375).

A figura 6 mostra um gráfico onde se relacionam as frações e os valores de densidade, calculados conforme o item 2.5.2 de Material e Métodos, evidenciando-se uma relação linear entre estes parâmetros.

3.3.1 Microscopia eletrônica

A observação do VLA-S4 purificado ao ME permitiu a constatação de partículas cheias, não penetradas pelo corante, partículas parcialmente penetradas e partículas vazias, penetradas pelo corante. As partículas virais, que se apresentaram sob a forma aproximadamente arredondada, quando submetidas ao tratamento rápido com AFT (Figura 7a) mostraram um diâmetro médio de $54,99 \pm 0,12$ nm (Tabela 1). Tais partículas, quando submetidas ao tratamento com AFT durante 30 s (Figuras 7b e 7c), perdem sua capa externa, expondo o nucleocapsídeo viral, e apresentam um diâmetro médio de $49,68 \pm 0,08$ nm (Tabela 2).

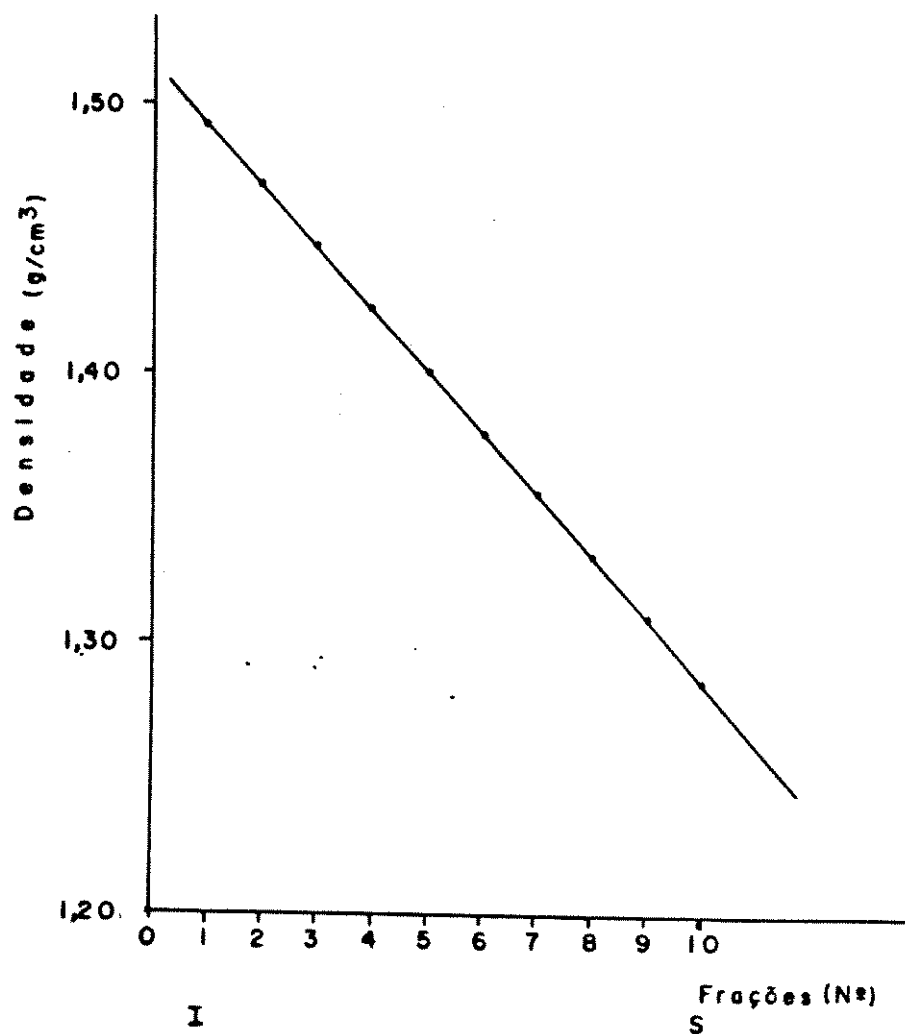
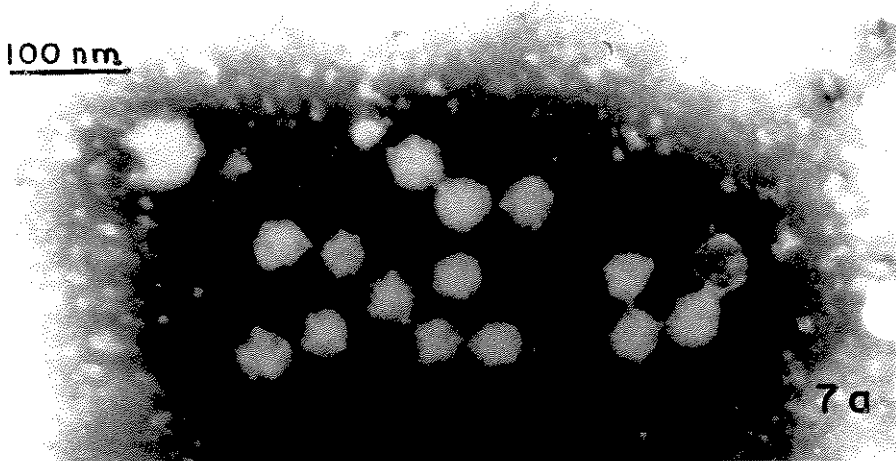


FIGURA 6: Densidade das frações obtidas na purificação do VLA-S4, em duas ultracentrifugações em gradiente de CsCl (Tris/HCl-Ca²⁺, pH 7,2).

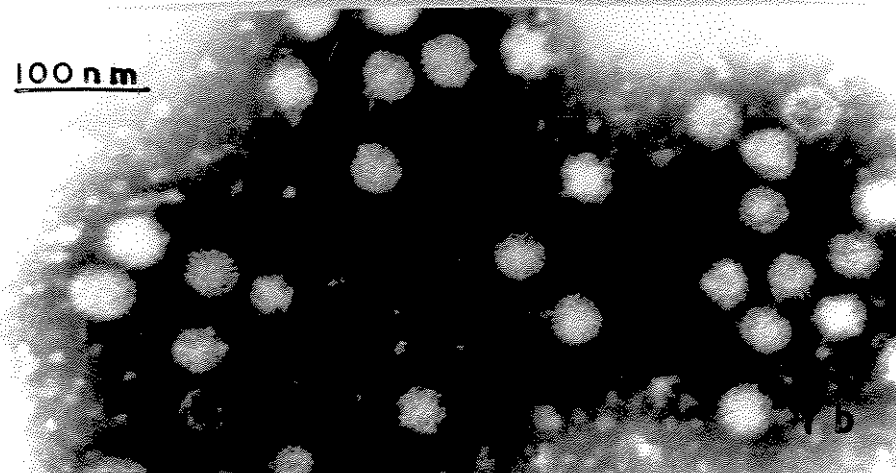
I = fração inferior

S = fração superior

100 nm



100 nm



50 nm

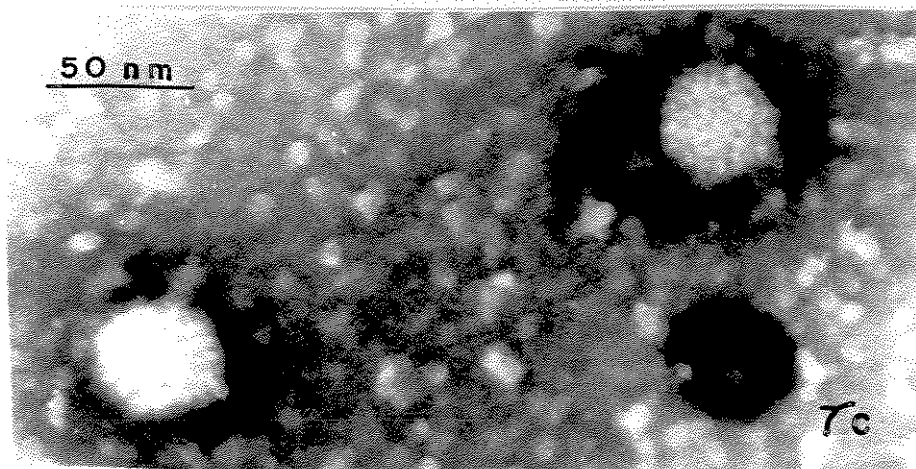


FIGURA 7: Microscopia eletrônica de partículas do VLA-S4, coradas negativamente pelo AFT a 2%. FIGURA 7a: AFT rápido. (aumento = 131.000 x). Notam-se partículas cheias, não penetradas pelo corante, partículas parcialmente penetradas e partículas vazias, penetradas pelo corante. O diâmetro médio destas partículas é de aproximadamente 55 nm. FIGURA 7b: AFT 30 s (aumento 142.000 x). Notam-se partículas um pouco menores que as da figura 5a. Trata-se de partículas sem a capa externa (nucleocapsídeo exposto), que medem em média, 49 nm. FIGURA 7c: Nucleocapsídeo viral (aumento = 309.000 x), correspondente à figura 7b.

TABELA 1: Diâmetro do VLA-S4, determinado em microscópio eletrônico EM 10B Carl Zeiss Oberkoclun a aumento de 131.000 x

Número de partículas	Diâmetro (nm)
3	48,09
6	49,63
10	51,91
18	54,96
13	57,25
6	58,02
4	59,54
3	61,07

$n = 63$

$\bar{x} = 54,99$ $s^2 = 0,20$ $s = 0,44$ $s_{\bar{x}} = 0,06$

$IC = \bar{x} \pm t \cdot s_{\bar{x}} = 54,99 \pm 0,12$, para $t(62) = 1,96$

n = número total de observações

$\bar{x}$ = média

s^2 = variância

s = desvio padrão

$s_{\bar{x}}$ = erro padrão da média

$t(62)$ = valor tabulado para $\alpha = 0,05$, com $n-1$ graus de liberdade

IC = intervalo de confiança

TABELA 2: Diâmetro do nucleocapsídeo do VLA-S4, determinado em microscópio eletrônico EM 10B Carl Zeiss Oberkoclun a aumento de 142.000 x

Número de partículas	Diâmetro (nm)
2	42,96
5	45,07
9	47,18
16	49,30
21	50,70
10	51,41
7	52,82
1	53,52
n = 71	
$\bar{x} = 49,68$	$s^2 = 0,11$ $s = 0,33$ $s_{\bar{x}} = 0,04$
IC = $\bar{x} \pm t \cdot s_{\bar{x}} = 49,68 \pm 0,08$, para $t(70) = 1,96$	

n = número total de observações

$\bar{x}$ = média

s^2 = variância

s = desvio padrão

$s_{\bar{x}}$ = erro padrão da média

t (70) = valor tabulado para alfa = 0,05 com n-1 graus de liberdade

IC = intervalo de confiança

3.3.2 Análise do ARN

O perfil eletroforético do ARN do VLA-S4, determinado através de EGPA, é mostrado na figura 8, onde se observa claramente a presença de dez segmentos. Os PM destes segmentos foram determinados através da equação de regressão linear (Figura 9), pela média de duas repetições e variaram de $2,92 \times 10^8$ d (segmento 1) a $0,49 \times 10^8$ d (segmento 10), conforme mostrado na tabela 3, com uma massa total de $15,81 \times 10^8$ d.

3.3.3 Análise das proteínas

A análise eletroforética das frações coletadas ao final do processo de purificação permitiu detectar sete proteínas (Figura 10). Os PM destas proteínas, calculados através da equação de regressão obtida a partir dos valores do logaritmo do PM das proteínas padrões (Figura 11), variaram de $103,69 \times 10^3$ d (VP1) a $30,24 \times 10^3$ d (VP7), com massa total de $419,050 \times 10^3$ d. Os valores de PM referidos na figura 10, correspondem à média de três repetições.

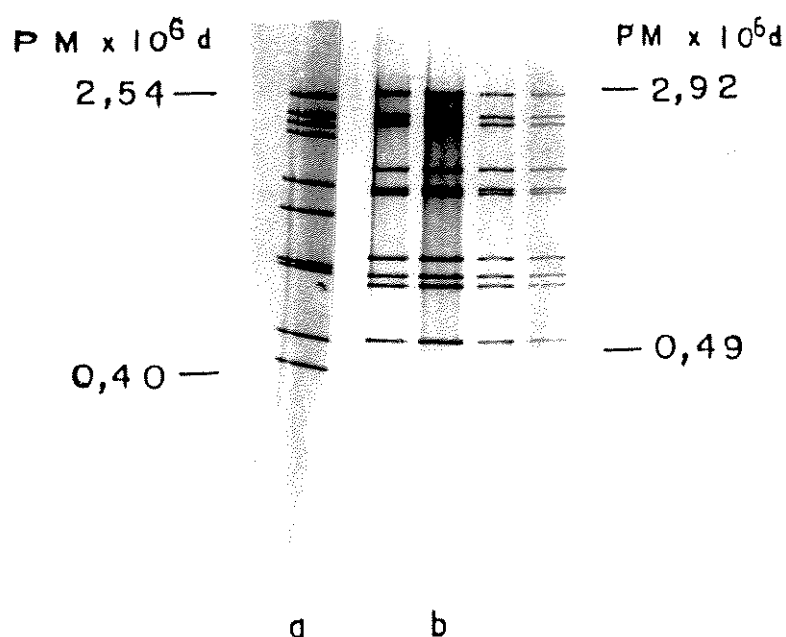


FIGURA 8: Perfil eletroforético do ARN do VLA-S4, coluna b (segmentos de 1 a 10, de cima para baixo) e da amostra SA-11 do rotavírus, coluna a (segmentos de 1 a 11, de cima para baixo). Gel de poliacrilamida a 7,5%, corado pela reação de ions prata. As três colunas semelhantes à coluna b, inclusive esta, referem-se às frações 5-6-7-8, coletadas após a segunda ultracentrifugação em CsCl.

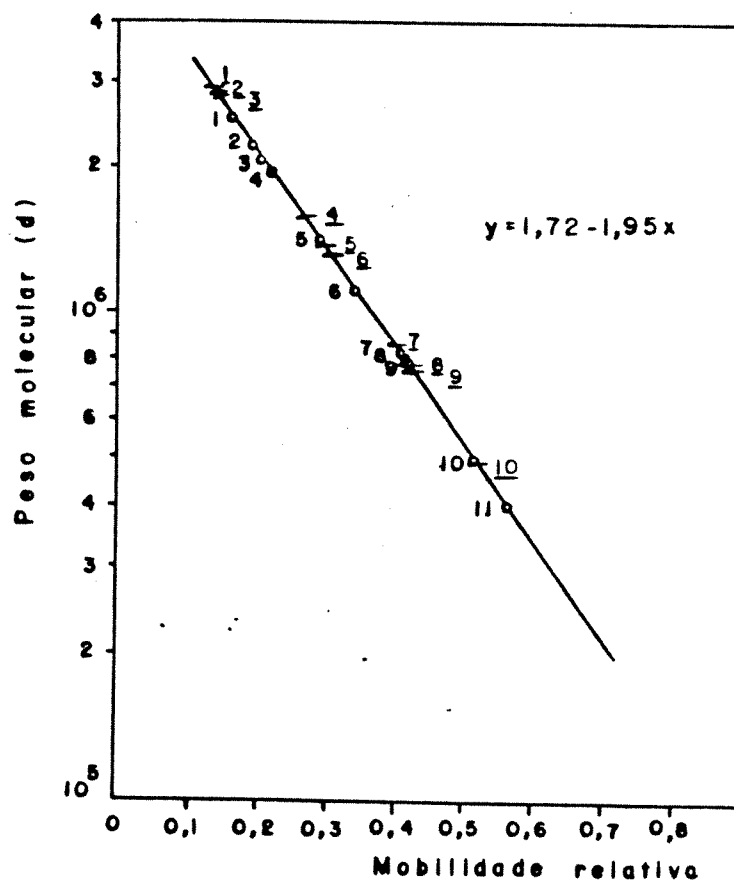


FIGURA 9: Cálculo do peso molecular (PM) dos segmentos de ARN, correspondentes à figura 8
 - = VLA-S4 (números grifados)
 o = amostra SA-11 do rotavírus, usada como padrão de PM

TABELA 3: . Peso molecular (PM) dos segmentos do genoma do VLA-S4 e da amostra padrão SA-11 do rotavírus, determinados com base na mobilidade eletroforética em EGPA e pela equação de regressão linear, correspondente às figuras 8 e 9, respectivamente

Segmentos (Nº.)	PM x 10 ⁶ d	
	SA-11 do rotavírus*	VLA-S4
1	2,54	2,92
2	2,23	2,87
3	2,09	2,84
4	1,96	1,59
5	1,41	1,38
6	1,12	1,32
7	0,82	0,87
8	0,80	0,78
9	0,78	0,75
10	0,50	0,49
11	0,40	-
Total	14,65	15,81

* Os valores do PM do SA-11 foram calculados pela média dos valores fornecidos por BOTH e col., 1982²³, e ESTES & COHEN, 1989⁶⁸.

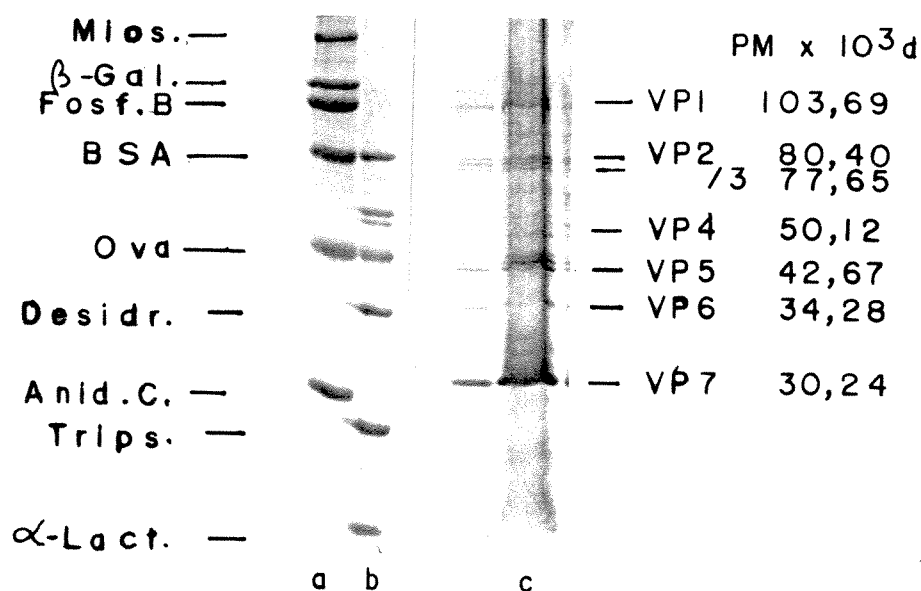


FIGURA 10: Eletroforegrama referente à eletroforese das proteínas do VLA-S4 em gel de poliacrilamida a 12%, com DSS 0,1% e realizada a 25 mA e 100 V, durante 3:30 h. Coloração: azul de "coomasie"

Amostras aplicadas:

a,b: mistura de padrões (PM indicados entre parênteses)

a: mistura de padrões miosina de músculo de coelho (205.000 d); beta galactosidase de *E.coli* (116.000 d); fosforilase B (97.400 d); albumina bovina (66.000 d); ovoalbumina (45.000 d) e anidrase carbônica de eritrócito de bovino (29.000 d)

b: mistura de padrões albumina bovina (66.000 d); ovoalbumina (45.000 d); desidrogenase 3 fosfato de músculo de coelho (36.000 d); tripsina de soja (24.000 d); alfa lactoalbumina (14.200 d)

c: proteínas virais. As duas colunas correspondem às frações 5-6, coletadas após a 2ª ultracentrifugação em CsCl.

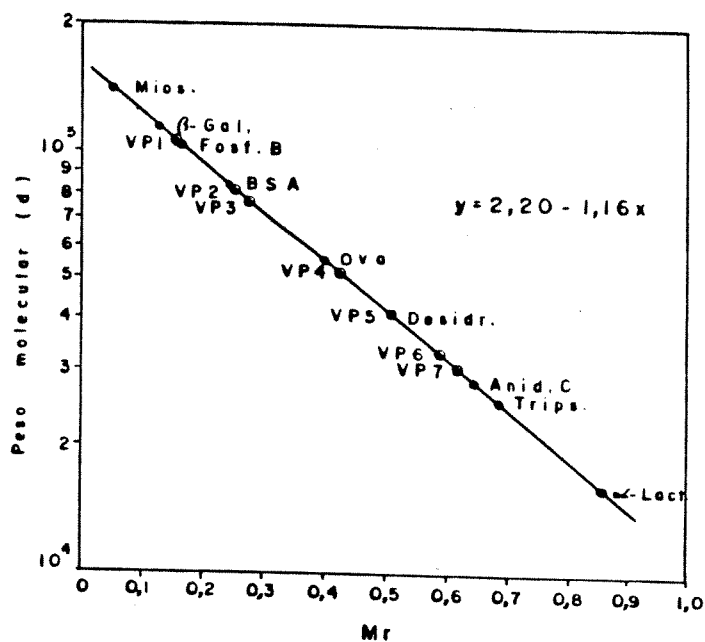


FIGURA 11: Cálculo do PM das proteínas do VLA-S4, correspondente à figura 10.

o = Proteínas do VLA-S4

● = Proteínas padrões

3.4 Antígeno solúvel

Durante a primeira fase de produção de antígeno solúvel, utilizando-se o sistema cassete (Millipore), o mesmo sofreu uma concentração de cerca de 100 vezes em relação ao volume inicial. Na segunda fase, usando ultrafiltração de membrana, a redução foi de 2 vezes, e o volume final de antígeno, 30 ml, representando 0,5% do volume inicial de preparação antigênica.

3.4.1 Teste de identidade

A figura 12 mostra um esquema da reação de imunodifusão dupla em gel de agar, realizada com os antígenos padrões (NADC e comercial) e o AS, frente ao soro-controle positivo. A identificação de uma única linha de precipitação, nítida e confluyente, indica que há uma relação de identidade total entre os três antígenos.

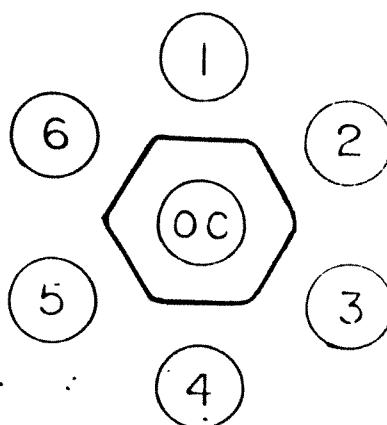


FIGURA 12: Esquema da reação de imunodifusão dupla em gel de agar - Teste de identidade

OC (orifício central): soro controle positivo

Orifícios 1 e 4: antígeno do NADC

Orifícios 2 e 5: antígeno solúvel (AS)

Orifícios 3 e 6: antígeno comercial (COM)

3.4.2 Perfil protéico do AS

Na figura 13. observam-se os perfis eletroforéticos dos antígenos padrões e do AS, que se apresentam semelhantes. Pode-se observar a predominância de duas bandas protéicas, presentes nas três preparações antigênicas, sendo uma superior mais intensa e outra mais fraca.

3.4.3 Especificidade da proteína

O material, coletado a partir da banda de precipitação formada entre o AS e o soro de ovino, inoculado experimentalmente com o VLA S4, e o de bovino, por IDGA, demonstrou a presença de uma única banda protéica (Figura 14), que se apresentou muito semelhante à banda proteica principal do AS. O PM desta proteína foi calculado, em relação ao dos padrões utilizados e o valor determinado foi de aproximadamente $60,00 \times 10^3$ d (Figura 15).

3.4.4 Avaliação semi-quantitativa

3.4.4.1 Imunodifusão radial simples

A figura 16 mostra um desenho esquemático da reação de Mancini, comparando os antígenos padrões e o AS, em diferentes diluições, frente ao soro-controle positivo diluído a 1/2.

O AS apresentou uma potência relativa ligeiramente superior à do antígeno do NADC e igual à do antígeno comercial, que apresentaram retas justapostas na curva de titulação, conforme mostrado na figura 17.

3.4.4.2 Titulação em bloco

Um desenho esquemático da reação de "OUCHTERLONY", onde se observa diferentes diluições do AS frente a diferentes diluições do soro-controle positivo, está sendo mostrado na figura 18. A diluição 1/4 foi a que apresentou menor concentração de antígeno capaz de reagir com concentrações mínimas de antissoro e o título de uso do AS foi determinado como sendo a diluição 1/2.



FIGURA 13: Perfil protéico do Antígeno solúvel (AS). Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, com DSS 0,1% e realizada a 25 mA e 100 V, durante aproximadamente 3:30 h. Coloração: azul de "coomasie"

Amostras aplicadas:

a, b: proteínas padrões, cadeia pesada (H) e cadeia leve (L) de imunoglobulina G (IgG) bovina

c: antígeno do NADC

d: antígeno comercial

e: antígeno solúvel (AS)

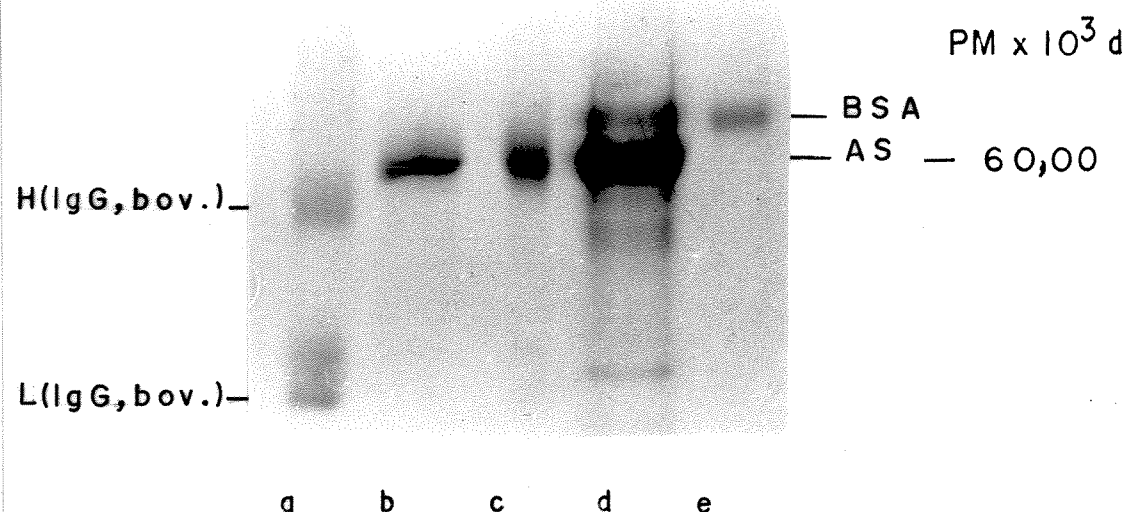


FIGURA 14: Eletroforegrama do antígeno solúvel (AS) e do material coletado a partir da banda de precipitação formada em IDGA.

Amostras aplicadas:

Padrões de peso molecular (PM indicados entre parênteses):

a: cadeia pesada (H) (PM 55.000 d) e cadeia leve (L) (PM 25.000 d) de imunoglobulina G (IgG) bovina

b: material proveniente da banda de precipitação formada pelo AS e o soro de ovino (inoculado experimentalmente com o VLA-S4).

c: material proveniente da banda de precipitação formada pelo AS e o soro-controle positivo de origem bovina.

d: antígeno solúvel (AS)

e: albumina bovina (PM 66.000 d)

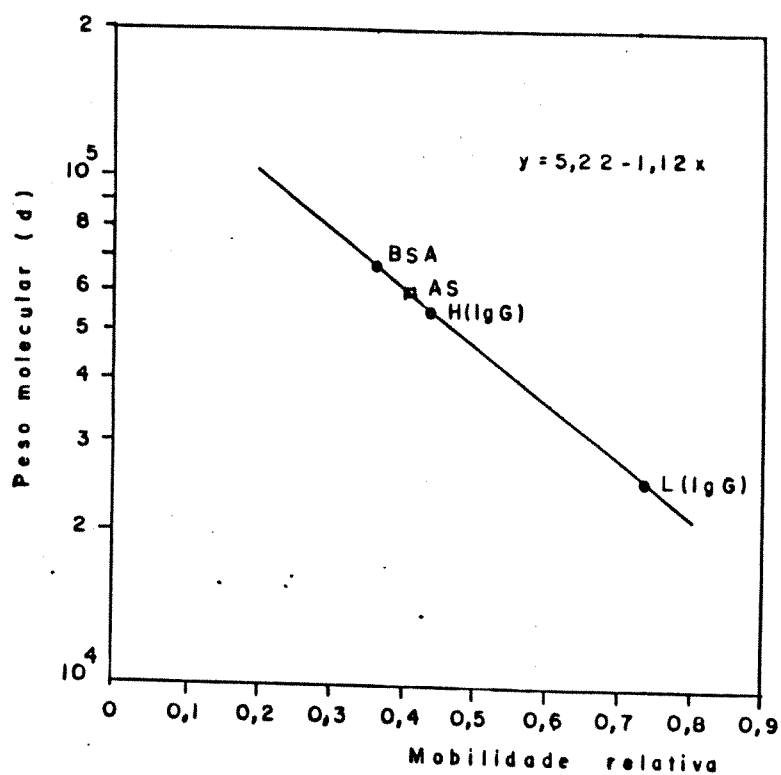


FIGURA 15: Cálculo do peso molecular da proteína do antígeno solúvel (AS), correspondente ao eletroforegrama mostrado na figura 14.

Ag	NADC	AS	COM
1/1			
1/2			
1/4			
1/8			

FIGURA 16: Esquema da imunodifusão radial simples de Mancini, mostrando o diâmetro dos halos de precipitação formados pelos antígenos do NADC, antígeno solúvel (AS) e antígeno comercial (COM), nas diluições 1/1 a 1/8 (base 2), frente ao soro-controle positivo (diluição final 1/2).

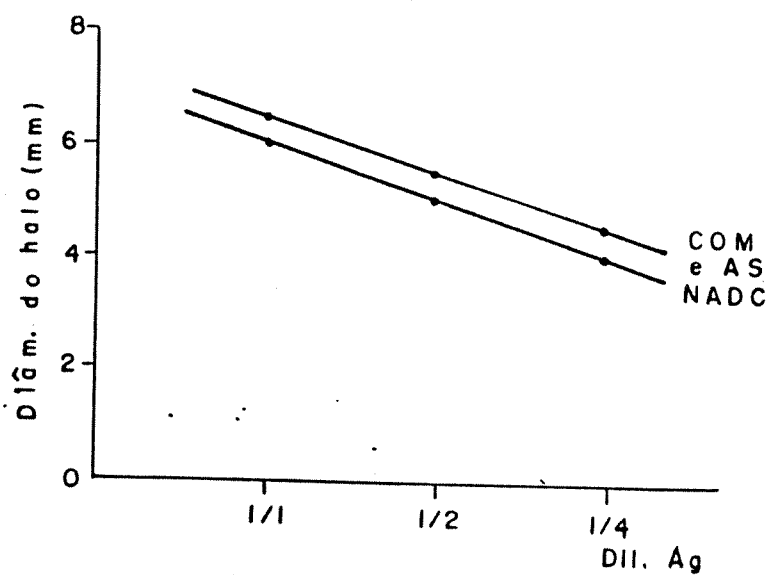


FIGURA 17: Curva de titulação, traçada com base nos valores dos diâmetros dos halos de precipitação formados pelos antígenos do NADC, AS e COM, correspondentes à figura 16.

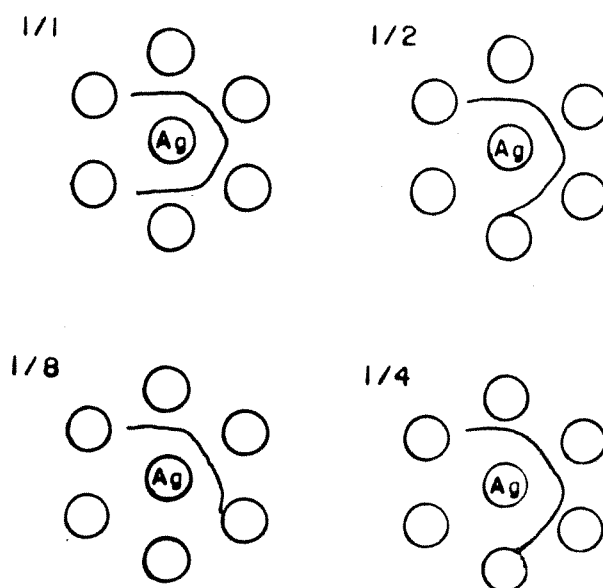


FIGURA 18: Esquema da titulação em bloco do antígeno solúvel (AS) nas diluições 1/1 a 1/8 (base 2) frente ao soro controle positivo, nas diluições 1/1 a 1/32 (base 2) em imunodifusão radial dupla em gel de agar.

3.5 Testes sorológicos

3.5.1 Imunodifusão em gel de agar

O teste de IDGA aplicado a 262 amostras de soros de campo, 190 de bovinos e 72 de ovinos, apresentou os resultados mostrados na tabela 4. As reações observadas puderam ser divididas em reações positivas, fracamente positivas e negativas, porém visando simplificar a apresentação dos resultados, tanto as reações positivas como as fracamente positivas foram denominadas apenas positivas (Tabela 4).

3.5.2 Imunofluorescência indireta

3.5.2.1 Purificação das imunoglobulinas de bovinos:

O perfil de eluição das proteínas séricas de bovinos obtidas em Sephadex G-200, após precipitação com sulfato de amônio, é mostrado na figura 19, onde se evidencia a existência de 3 picos. As frações que determinaram os picos I, II e III, quando estudadas por imunoeletroforese, mostraram a presença de imunoglobulinas da classe IgM e a proteína alfa macroglobulina, imunoglobulinas das classes IgA e IgG e exclusivamente IgG, respectivamente.

As frações - que determinaram o pico III, obtidas em duas cromatografias em Sephadex G-200, foram utilizadas para a preparação do soro hiperimune.

3.5.2.2 Produção, purificação e marcação das IgG de coelhos

Após a preparação dos antissoros de coelhos anti-IgG de bovinos e ovinos, as IgG de coelhos, separadas por DEAE Sephadex A-50, foram eluídas e a concentração protéica final das amostras foi ajustada para 20 mg/ml, para o preparo do conjugado.

Os conjugados obtidos a partir da marcação das IgG de coelhos anti-IgG de bovinos e de ovinos com ITCF, quando titulados, mostraram valores de 1/50 e 1/70, respectivamente. Estes títulos representaram as maiores diluições de conjugado que proporcionaram fluorescência específica e nítida.

3.5.2.3 Reação de imunofluorescência indireta

A reação de imunofluorescência indireta, realizada em células VERO cultivadas em lamínulas coletadas 48 h pós-infecção, está sendo mostrada na figura 20. A fluorescência foi intra-citoplasmática e, em algumas células, observada apenas na membrana celular.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos pela aplicação do teste de IFI a 262 amostras de soros de campo, sendo 190 de bovinos e 72 de ovinos.

TABELA 4: Resultados obtidos pela aplicação da IDGA em soros de bovinos e ovinos no diagnóstico da LA

IDGA	Nº. de soros testados		
	Bovinos	Ovinos	Total
Positivo	96	38	134
Negativo	94	34	128
Total	190	72	262

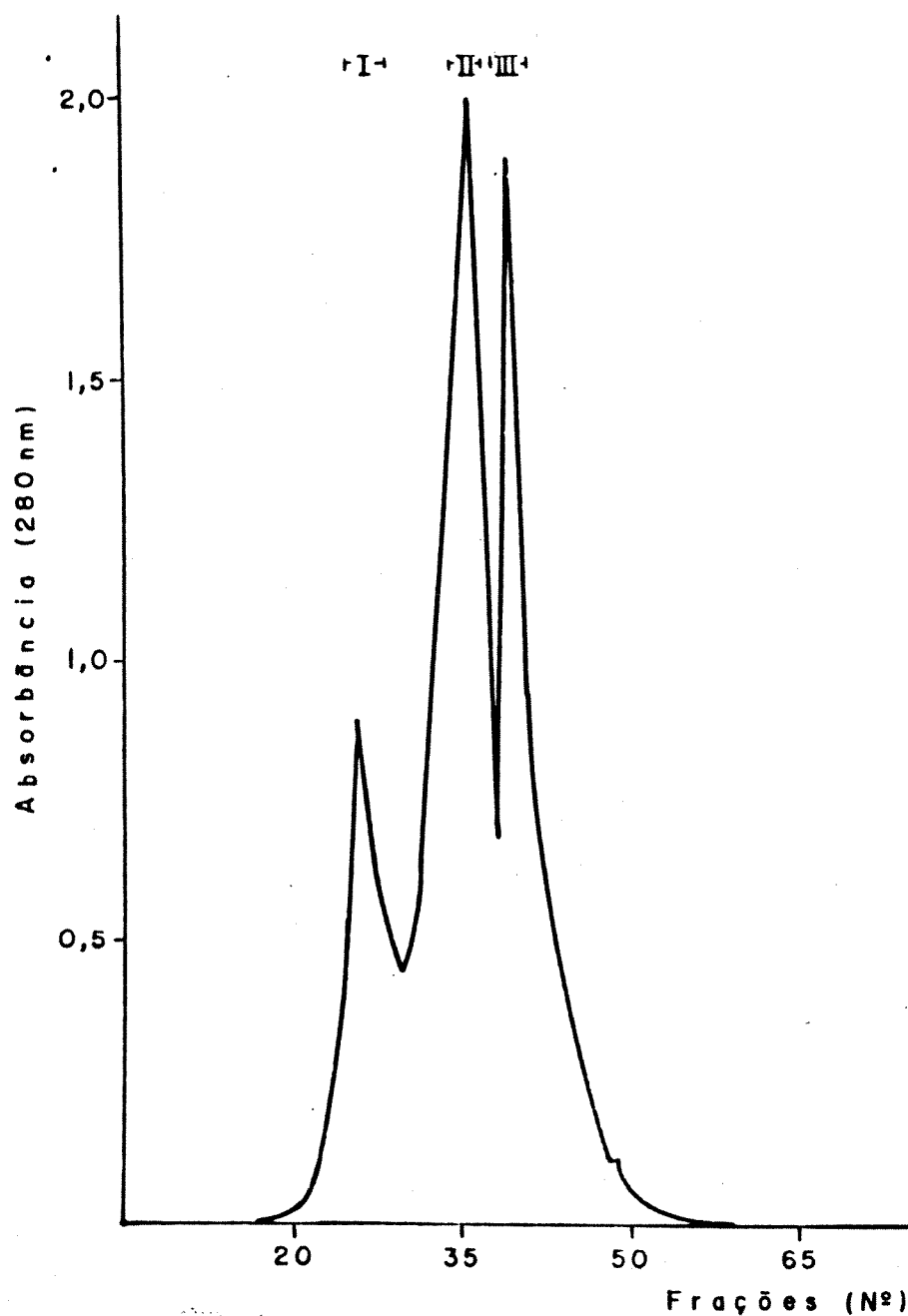


FIGURA 19: Perfil de eluição das proteínas séricas de bovinos por cromatografia em Sephadex G-200 (TFS 0,05 M, pH 8,0, em coluna de 90 x 2,5 cm) após precipitação com sulfato de amônio a 40% (3 x).

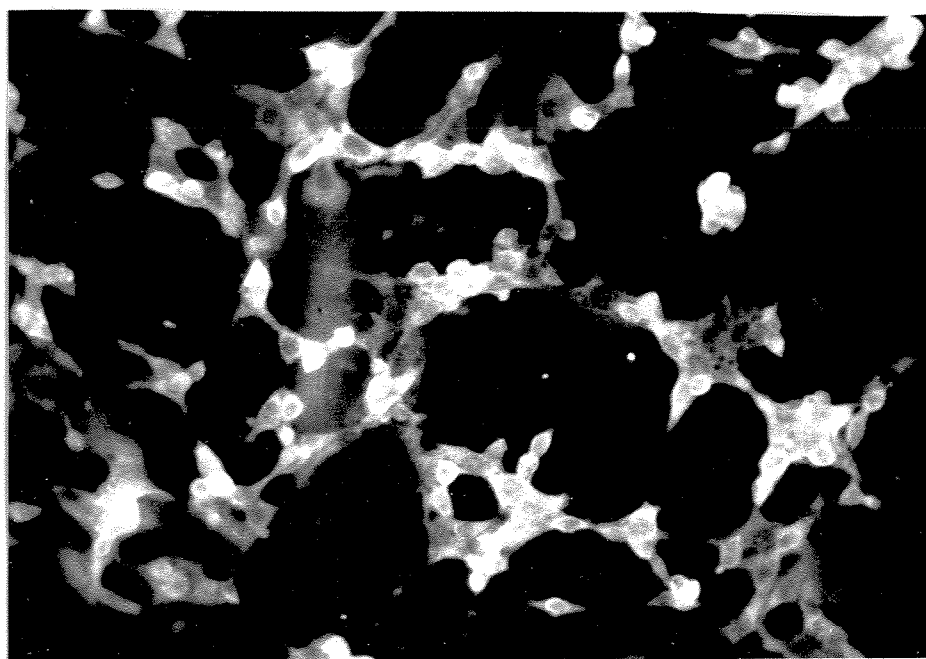


FIGURA 20: Padrão de fluorescência mostrado por imunofluorescência indireta (IFI) em células VERO infectadas pelo VLA-S4.

TABELA 5: Resultados obtidos pela aplicação da IFI em soros de bovinos e ovinos para diagnóstico da LA

IFI	Nº. de soros testados		
	Bovinos	Ovinos	Total
Positivo	98	39	137
Negativo	92	33	125
Total	190	72	262

3.5.3 Análise estatística dos dados sorológicos

A tabela 6 foi elaborada a partir dos dados contidos nas tabelas 4 e 5 visando comparar a prova de IFI com o método-padrão, IDGA, considerando os soros de bovinos e ovinos. Com base nestes resultados, foi determinado o Coeficiente de Yule, o qual registrou associação de elevada intensidade entre ambas as provas, tanto no que concerne aos soros de bovinos (98,77%), quanto aos soros de ovinos (97,74%).

A partir dos valores referidos na tabela anterior, determinaram-se os graus de S, E, VPR+ e VPR- da prova de IFI, bem como o grau de C entre as duas provas, para ambas as espécies animais, originando-se a tabela 7.

A análise da tabela 7 permite constatar que os valores dos parâmetros de validação da prova de IFI são elevados, situando-se, para soros de bovinos, acima dos 91%, e dos 88%, para os soros de ovinos. Por outro lado, a comparação dos valores dos diferentes parâmetros de validação da IFI, através do Teste "Z", para duas proporções com aproximação normal, não registrou qualquer diferença estatisticamente significativa ao nível de rejeição adotada, igual a 5%.

Na tabela 8 estão expressas as verdadeiras proporções de S, E, VPR+, VPR- e C para os Limites de Confiança iguais a 95%. Para os soros de ambas as espécies animais em estudo, a prova de IFI registrou valores elevados para os diferentes parâmetros analisados, situando-se todos os limites mínimos acima de 80%.

TABELA 6: Resultados das provas de IFI e IDGA obtidos em soros de bovinos e ovinos, segundo as espécies animais e os tipos de reação

IDGA	IFI					
	Bovinos			Ovinos		
	+	-	T	+	-	T
Reagente	90	6	96	35	3	38
Não-reagente	8	86	94	4	30	34
Totais	98	92	190	39	33	72

+ = Reagente ou positivo
 - = Não-reagente ou negativo
 T = Total

TABELA 7: Valores dos parâmetros de validação da prova de IFI, em relação ao método padrão de IDGA, segundo as espécies animais em estudo

PARAM	Bovinos	Ovinos
	%	%
S	93,75	92,11
E	91,49	88,24
VPR+	91,84	89,74
VPR-	93,48	90,91
C	92,63	90,28

PARAM = Parâmetros

S = Sensibilidade

E = Especificidade

VPR+ = Valores preditivos dos resultados positivos

VPR- = Valores preditivos dos resultados negativos

C = Concordância

TABELA 8: Proporções dos parâmetros de validação da prova de IFI, em comparação com o método padrão IDGA, para os Limites de Confiança iguais a 95%, segundo as espécies animais

PARAM	BOVINOS		OVINOS	
	%		%	
S	90,31	:-----: 97,19	85,88	:-----: 98,33
E	87,52	:-----: 95,46	80,79	:-----: 95,68
VPR+	87,94	:-----: 95,73	82,74	:-----: 96,75
VPR-	89,97	:-----: 96,99	84,27	:-----: 97,55
C	88,91	:-----: 96,35	83,44	:-----: 97,12

PARAM = Parâmetros

S = Sensibilidade

E = Especificidade

VPR+ = Valores preditivos dos resultados positivos

VPR- = Valores preditivos dos resultados negativos

C = Concordância

4 DISCUSSÃO

As linhagens BHK-21 e VERO são frequentemente utilizadas, como padrão, em trabalhos com o VLA, sendo que a linhagem VERO é a mais utilizada para ensaios em placas e de titulação viral^{21,91,98,112,118,130,147,177}.

Os dados existentes na literatura, sobre a replicação do VLA, divergem no que diz respeito ao comportamento deste vírus em diferentes substratos biológicos utilizados para a sua propagação^{21,31}. As principais variações descritas estão relacionadas ao grau de replicação e título viral obtidos, ao tipo de amostra a ser coletada^{118,145}, ao tratamento mais adequado do material a ser inoculado^{31,73,118}, à quantidade de inóculo e à patogenicidade da cepa viral^{118,145}. Outras variações podem estar relacionadas à sensibilidade dos cultivos celulares, em função da água utilizada na preparação dos meios de cultura, composição salina básica dos meios e suplementação com uma variedade de soros^{31,118,145,175}.

Na opinião de diversos autores, as variações referidas podem ser influenciadas pela presença de eletrólitos^{31,118} ou de receptores celulares apropriados¹⁷⁷, que poderiam facilitar a ligação do VLA às células, favorecendo deste modo a sua replicação.

Entre os fatores que poderiam diminuir a eficiência da replicação viral nos vários substratos biológicos, são citados na literatura: a presença de

inibidores da atividade viral, tais como os anticorpos específicos, provavelmente produzidos em resposta à infecção transplacentária pelo VLA^{55.117.122}; e presença de inibidores de origem desconhecida, que foram descritos pela primeira vez por PINI e col., em 1966¹⁴⁵, e mais tarde por BLANCHARD-CHANNEL e STOTT, em 1989²¹; a produção de partículas virais defectivas interferentes e, secundariamente, a produção de interferon referidas por McPHEE e col., em 1982¹³⁰.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a amostra do VLA-S4 usada, por tratar-se de uma cepa já adaptada a cultivos celulares, foi introduzida facilmente na rotina laboratorial após duas passagens sucessivas em células BHK. No entanto, os baixos valores obtidos nas titulações virais, levando à necessidade de grande volume de inóculo, podem ter sido influenciados por um ou vários dos fatores citados anteriormente.

Em relação ao efeito citopático, os resultados obtidos foram compatíveis com a orientação do NADC¹⁴⁸, que considera 72 h o tempo ótimo de descolamento do tapete celular, quando o ECP deve ser igual ou superior a 80%, embora, em algumas ocasiões, o tempo de incubação tenha se estendido para 96 h, sendo encontrados, na literatura, citações de tempo de incubação até maiores que este, em trabalhos de infecção pelo VLA^{73.177}.

As modificações da morfologia das células infectadas, observadas ao microscópio comum, foram

parâmetros úteis para o controle do ECP e preparação das suspensões virulentas.

O acompanhamento do ECP, no presente estudo, demonstrou concordância com as alterações celulares descritas por HAIG e col., 1956⁷⁸, e LIVINGSTON e col., 1972¹¹⁴, que encontraram, nos estágios iniciais, focos primários de atividade viral, caracterizados pela presença de células ou pequeno número de células agrupadas, evoluindo com distintos graus de retração, seguidos de perda da forma original, formação de agrupamentos maiores e início de descolamento do tapete celular, na fase intermediária.

O citoplasma apresentou aspecto granular, padrão também demonstrado por imunofluorescência ^{82.100.152}, descolamento progressivo da monocamada e alongamento de células, nos estágios mais adiantados do processo. Tal resultado é compatível com as informações de CASTRO e col., em 1989³⁷, que também encontraram células com prolongamentos, no final do processo de replicação, quando testavam a susceptibilidade de uma linhagem celular - originária de língua de feto ovino - a várias cepas do VLA.

A purificação do VLA constitui uma grande limitação para o estudo deste vírus e, conseqüentemente, da doença. Estas dificuldades estão associadas, principalmente, à forte tendência de as partículas virais se ligarem aos resíduos celulares, dificultando a sua separação e a purificação, e à instabilidade relativa das mesmas, quando purificadas^{112.128.134.158.170}.

Estes obstáculos explicam o fato de que as primeiras tentativas de purificação do VLA realizadas por POLSON, em 1948, e por OWEN & MUNZ, STUDDERT, PANGBORN e ADDISON, em 1966, citados por HOWEL & VERWOERD, 1971⁸⁸, não terem conduzido a resultados satisfatórios.

A extração de partículas virais, a partir do sedimento de culturas celulares infectadas, foi introduzida por VERWOERD, em 1969¹⁷⁰, quando demonstrou que 80% da infectividade viral estava associada ao material que permanecia ligado às células, metodologia esta que vem sendo utilizada até o momento. O procedimento que apresentou maior reprodutibilidade e menor perda, entre os vários utilizados por este autor, foi o da ruptura osmótica das células, com subsequente digestão pela quimotripsina e tratamento do extrato citoplasmático com fluorocarbono, na presença de Sephadex G-200, seguido da adição de Tween 80 e extração pelo éter.

Vêm sendo testadas várias alternativas no processo de purificação dos distintos sorotipos do VLA, que podem apresentar comportamentos diferentes de acordo com as condições experimentais. As principais modificações descritas referem-se, principalmente, ao tratamento químico inicial, pelo uso de substâncias tais como: Triton X 100, em diferentes concentrações^{2,91,134}; Genesolv D¹⁰⁴; Nonidet P 40¹⁰⁹ e EDTA, empregados por MERTENS e col., em 1984¹³³, e MERTENS e col., em 1987¹³⁴, que descreveram um método de purificação do VLA, trabalhando com os sorotipos 1 e 4.

Estes autores utilizaram, ainda, ditiotreitól, desoxicolato de sódio e quimotripsina.

Em todos os métodos referidos, estão incluídas pelo menos uma ultracentrifugação em gradiente ou sedimentação das partículas virais em sacarose e duas, ou mais, em gradiente de cloreto de cézio (CsCl), com variações na velocidade e tempo, como no presente estudo.

O VLA é sensível a condições ácidas e a altas concentrações de sais, sendo instável em gradientes de CsCl^{34.189.172}: como consequência, costuma ser degradado seletivamente nos gradientes de CsCl, em função dos referidos fatores e em relação às variações de pH^{34.88.111.135.170.172}.

No método de purificação empregado no presente trabalho, constatou-se que, na primeira ultracentrifugação em CsCl, foram encontrados resíduos celulares na região de maior concentração de vírus. Esta observação é concordante com a de outros autores^{128.170.172}, que também citam a presença de vírus nos resíduos celulares. Foi então necessária uma centrifugação adicional, para a eliminação dos resíduos celulares, ocasionando, provavelmente uma redução no rendimento final, provocada pela presença de partículas virais intimamente associadas a esses resíduos.

As partículas virais localizaram-se em uma única banda, sugerindo que o procedimento utilizado neste estudo de ultracentrifugação em CsCl, pH 7,2, não provocou

degradação seletiva, discordando dos resultados obtidos por vários autores^{34.128.170.172}, que observaram mais de uma banda nesta faixa de pH. Para se tentar explicar esta discordância de resultados, é conveniente lembrar dois aspectos: a) o sorotipo S4 parece ser muito estável independentemente do processo de purificação utilizado; b) o tampão empregado no caso do presente estudo, continha íons Ca, que eventualmente poderiam funcionar como estabilizador. No entanto, este aspecto não foi avaliado.

Através de ME, dois tipos distintos de partículas do VLA têm sido descritos, a partir de observação das diferentes bandas obtidas em gradiente de densidade^{29.53.128.133.134.170.172}. VERWOERD e col., em 1972¹⁷², demonstraram que a estrutura externa das partículas do VLA é formada por uma capa difusa, que se encontra circundando o nucleocapsídeo. Esta observação contribuiu para o esclarecimento das discrepâncias encontradas na literatura sobre a estrutura e o tamanho do virion, permitindo estudos comparativos com os reovírus e outros orbivírus^{67.128.170.172}.

A forma aproximadamente esférica e o diâmetro de $54,99 \pm 0,12$ nm encontrados para as partículas virais purificadas do VLA-S4, no presente estudo, são compatíveis com os dados encontrados na literatura, que menciona diâmetros médios do virion de 50 a 70 nm ^{29.34.53.77.128.135.170}.

O nucleocapsídeo viral, com diâmetro estimado de 45 a 55 nm, apresenta estrutura capsomérica constituída de 32 subunidades. Estas subunidades circulares, ou capsômeros, organizadas de forma hexagonal ou pentagonal, encontram-se distribuídas regularmente ao redor de um eixo de simetria icosaédrica^{29.53.128.172}.

As partículas virais com diâmetro médio de $49,68 \pm 0,08$ nm, também observadas neste estudo do VLA-S4, resultantes do tratamento das partículas virais purificadas com ácido fosfotúngstico, durante 30 s, apresentaram morfologia semelhante à descrita por vários autores para o nucleocapsídeo do VLA^{53.128.172}, sugerindo tratar-se do nucleocapsídeo viral da cepa estudada.

A linearidade dos valores de densidade das frações do gradiente de CsCl foi consistente com os resultados obtidos por BRUNER e VINOGRAD, 1965³²; o valor da densidade da fração correspondente à banda obtida, para o VLA-S4 ($1,38 \text{ g/cm}^3$), é semelhante ao encontrado por VERWOERD, em 1969¹⁷⁰, e que vem sendo confirmado por vários outros autores^{34.53.128}.

O ARN extraído do sedimento de células infectadas, do sobrenadante de culturas e das amostras purificadas, estudado por EGPA, apresentou padrão eletroforético, número e os pesos moleculares dos segmentos compatíveis com os dados apresentados na literatura sobre o VLA^{34.128.172}. A metodologia empregada demonstrou

reprodutibilidade e possibilidade de aplicação no acompanhamento das culturas celulares infectadas.

A análise das proteínas do VLA-S4 também demonstrou resultados similares aos descritos por diversos pesquisadores^{11,87,91,93,95,128,170,172}. Foram caracterizadas as bandas protéicas que, provavelmente, correspondem às sete proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, e VP7), com seus respectivos PM. Embora não tenha sido mostrado, nos resultados aqui expostos, houve, esporadicamente, a formação de duas bandas adicionais com PM estimados em 30,00 e 15,00 x 10³ d, que corresponderiam às proteínas referidas por MERTENS e col., 1984¹³³, em estudos de codificação do VLA-S1. Estes autores admitiram que a proteína com mobilidade eletroforética semelhante à da VP7 poderia ser resultante de modificação desta e a que apresentava PM 15.000 d corresponderia à proteína P8, sintetizada pelo segmento 10 do genoma viral. Admitiram, ainda, que esta última tratava-se de uma proteína estrutural do capsídeo externo e, embora não tenham conseguido confirmar esta possibilidade, através da clivagem das proteínas 2 e 5, atribuíram o fato às variações de mobilidade eletroforética das proteínas e dos segmentos genômicos, observadas em diferentes condições experimentais.

O uso da linhagem VERO, no presente estudo, para a produção do antígeno solúvel, deveu-se ao risco de reações falso-positivas, com antígenos preparados em células BHK, em testes de IDGA e EIE indireto em soros de animais

provenientes da Colombia, conforme relatou ANDERSON, 1984¹⁰. Este risco está relacionado ao uso sistemático em bovinos de vacinas contra a febre aftosa, produzidas, na maioria das vezes, em células BHK.

Ao contrário dos métodos de purificação das partículas virais do VLA, na produção do antígeno solúvel utiliza-se, preferencialmente, o sobrenadante das culturas celulares infectadas. A fração solúvel, contida no mesmo, tem sido a base das preparações antigênicas utilizadas no diagnóstico da LA, pela técnica de imunodifusão em gel de agar^{85,88,101,102,148,175}.

Vários autores concluíram que esta fração era constituída de componentes virais de natureza protéica, desprovida de ARN, não-infecciosa, mas que estava intimamente associada à replicação viral, sendo produzida no início do processo de replicação e, provavelmente, oriunda de um precursor sintetizado em excesso no ciclo viral^{87,90,91,133,175}.

A estabilidade a 4°C das preparações antigênicas obtidas a partir da fração solúvel e a presença de componentes comuns a todos os sorotipos testados, demonstradas por KLONTZ e col., 1962¹⁰⁷, foram confirmadas posteriormente por JOCHIM e CHOW, 1969¹⁰¹, que detectaram anticorpos grupo-específicos para antígeno de mesma origem.

O uso do sistema de ultrafiltração seletiva em membrana com capacidade nominativa limitante (CNL) de 50.000, introduzido por JOCHIM, em 1976¹⁰², constituiu-se em

um passo importante no processo de concentração e seleção do tamanho relativo das partículas presentes na fração solúvel. Entretanto, os resultados obtidos pelo mesmo autor, usando cromatografia em coluna de Sephadex G-200, levaram à diminuição do título do antígeno e eliminação de linhas múltiplas, sem contudo haver aumento da especificidade.

As preparações de antígeno, a partir do material viral ligado às células, como alternativa para uso em IDGA, apresentaram baixa sensibilidade, identidade parcial com o antígeno solúvel e a presença de grande quantidade de partículas virais^{102.175}.

A simplificação do diagnóstico da LA, pelo uso de reações grupo-específicas, vem sendo testada por vários autores, com preparações obtidas por colunas de Sephadex G-200, Sepharose 4B, eletrofocalização, proteína 74.85.102 e proteína 3⁸⁵, entre outras.

Os resultados obtidos, no presente trabalho, em relação ao rendimento e seleção do tamanho das partículas, foram satisfatórios, quando se utilizou o sistema de ultrafiltração sequencial do sobrenadante de células VERO infectadas, em membrana de 10.000, e a seguir, de 25.000.

A centrifugação a 100.000 g, realizada ao final do processo de concentração, também contribui para eliminar partículas virais eventualmente presentes e para melhorar o grau de pureza da preparação antigênica (C.R.RANGER, 1987 - comunicação pessoal).

O teste de identidade, realizado para avaliar a relação imunológica entre o AS e os antígenos do NADC e o comercial, demonstrando identidade total entre eles, sugere que os mesmos não podem ser distinguidos pelo antissoro usado^{20,186}.

O estudo do perfil eletroforético do AS, comparado ao dos antígenos do NADC e o comercial, mostrou semelhança entre as bandas protéicas presentes nos três antígenos e também sugere que as preparações antigênicas sejam semelhantes.

Vários autores, analisando o PM das proteínas contidas no AS usado em IDGA, obtiveram resultados discrepantes. GUMM & NEWMAN, 1982⁷⁴ e HUBSCHLE & YANG, 1983⁸⁵ encontraram, em suas preparações antigênicas, componentes protéicos com mobilidade eletroforética e PM em torno de 38.000 d, semelhantes à proteína 7 do VLA. Estes dados discordam dos valores observados por JOCHIM & CHOW, 1969¹⁰¹ e WANG e col., 1972¹⁷⁵, que relataram PM de 160.000 a 200.000 d e 208.000 d, respectivamente. Estes resultados foram justificados por JOCHIM e CHOW, 1969¹⁰¹, que admitiram tratar-se de estruturas complexas constituídas de subunidades de 38.000 d e que o AS, originalmente, se apresentava como uma estrutura polimérica.

A precipitação e o estudo eletroforético do extrato solúvel do VLA, realizados por HUISMANS & ELS, em 1979⁸⁹, demonstraram a presença de dois polipeptídeos não-estruturais (NS1 ou P5a e NS2 ou P6a) e as sete proteínas

estruturais, sendo ainda descritas, na literatura, outras duas proteínas não-estruturais, NS3 e NS4^{131.189.171}. A identificação da proteína NS1 ou P5a, com PM 54.000 d, que apresentou capacidade de se converter rapidamente em um complexo de alto PM e coeficiente de sedimentação 400 S, pode confirmar as observações de JOCHIM & CHOW, 1969¹⁰¹ sobre as estruturas complexas do AS.

Os métodos utilizados, recentemente, têm possibilitado estudos mais precisos dos segmentos do genoma, das proteínas e da sua codificação^{52.53.62.89.79.92}. Vários estudos confirmam as afirmações de que a proteína 7 é o antígeno grupo-específico mais importante^{34.88.90.91.111}, havendo, pelo menos, dois epítopos expostos na superfície do virion¹¹¹.

HUISMANS e CLOETE, em 1987⁹² descreveram, no entanto, que o segmento do genoma que codifica esta proteína não apresenta estrutura altamente conservada, nos sorotipos estudados, havendo outras proteínas do VLA, tais como, VP3, NS1 e inclusive a VP5, que têm demonstrado apresentar maior grau de conservação estrutural, semelhança entre vários sorotipos, associação a microtúbulos e participação na reação grupo-específica^{51.79.87.88.90.93.95.131.133}.

O resultado obtido no presente estudo, com relação ao valor do PM encontrado para o componente protéico principal do AS ($60,00 \times 10^3$ d), extraído tanto da linha de precipitação formada entre este antígeno e o soro de ovino inoculado experimentalmente com o VLA-S4, e como daquela

formada com o soro de bovino, através de IDGA, sugere que tal componente protéico trata-se, provavelmente, da proteína NS1 (P5a) ou da VP5 e não da proteína VP7 (PM 30,00 x 10³ d), discordando dos autores que afirmam ser esta última proteína, a principal responsável pela linha de precipitação formada em IDGA^{11,85}.

A avaliação semi-quantitativa do AS, realizada pelo teste de imunodifusão simples, apresentou-se compatível com os resultados obtidos para os antígenos padrões.

Com base nos testes de padronização do referido antígeno, demonstrou-se que o mesmo se encontra em condições de ser utilizado na rotina de diagnóstico sorológico da LA, pela IDGA.

O AS, usado em IDGA, apresenta reações cruzadas com anticorpos para o vírus da doença epizootica hemorrágica - VDEH^{33,85}. Com base no grande número de reações cruzadas entre os orbivirus descrito na literatura, CAMPBELL, 1985³³, concluiu que uma amostra positiva, contendo anticorpos para o antígeno de grupo do VLA não significa, necessariamente, que o animal foi exposto a um dos sorotipos deste vírus. A produção de anticorpos poderia ter sido estimulada por algum dos orbivirus relacionados, que apresentam relação antigênica com um ou mais sorotipos do VLA.

E, então, mais correto o uso da expressão "diagnóstico de língua azul e orbivirus relacionados".

quando se emprega esta técnica diagnóstica, apesar da maior importância do VLA como agente causador de doença, em particular nos ruminantes domésticos.

O melhor procedimento para caracterizar a LA é, sem dúvida, o isolamento viral a partir de casos clínicos^{33.143.153.175}. No entanto, a forma de apresentação silenciosa ou inaparente da doença, com predominância de casos subclínicos, tem tornado este procedimento extremamente difícil^{8.31.38.48.112.141.175}.

A ocorrência de LA com predominância de casos subclínicos tem sido descrita com certa frequência no Brasil, onde se relata alta disseminação do vírus^{12.44.45.46.138}, infecção inaparente em várias espécies ruminantes, poucos registros de casos clínicos sem confirmação laboratorial por isolamento de vírus, exceto o sorotipo 4, que foi isolado nos EUA de bovino originário do Brasil⁷³. CUNHA e col., 1988⁴⁶, com base em dados da literatura, admitiram que estes fatos poderiam ser consequência da maior resistência dos animais locais e/ou da presença de cepas de baixa virulência.

HUISMANS e BREMER, em 1981⁹⁰ e LUEDKE e col., em 1985¹¹⁹ admitem que o S4 é um dos sorotipos mais estáveis do VLA, a nível de campo, e sugerem que o mesmo seja o precursor dos outros sorotipos, pelo fato de ter sido a primeira cepa a ser isolada no sul da África, ser a mais difundida mundialmente e apresentar relação com um grande número de sorotipos.

A detecção e/ou isolamento do vírus a partir de insetos vetores pode ser, também, uma forma de confirmação da atividade viral e da caracterização da doença, em um país ou em uma região geográfica.

A possível presença de insetos vetores⁴⁵, infecções subclínicas em bovinos, ovinos e caprinos, conforme citado anteriormente, condições climáticas adequadas e demais componentes da cadeia epidemiológica, que favorecem a infecção de animais susceptíveis ao VLA, sugerem atividade frequente do vírus no nosso meio.

Maior número de investigações e consultas a respeito da presença destes vetores, em áreas de ocorrência do VLA, seria importante e necessário para permitir relacioná-la com a doença. Para a execução destas atividades se faz necessária a organização de equipes de coleta, além de estrutura laboratorial especializada para isolamento e identificação viral.

A necessidade de confirmar o diagnóstico de outras doenças do complexo mucoso^{27.28.46.77.115.138.153}, tais como febre aftosa, de ocorrência endêmica em praticamente todo o país *, estomatite vesicular, esporádica em alguns Estados da Federação^{7.48}, rinotraqueíte infecciosa

* CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA - Informe Epidemiológico sobre Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular - Información Semanal sobre Presencia de Enfermedades Vesiculares en las Americas.

bovina, de ocorrência pouco determinada (S.B.K.MUELLER, 1988 - comunicação pessoal) e o aumento gradativo do número de abortos sem causa definida, principalmente em bovinos (M.RETORI, 1989 - comunicação pessoal), entre outros quadros clínicos duvidosos relatados por Médicos Veterinários da CATI, levam à necessidade do estabelecimento de uma infra estrutura que permita a realização do diagnóstico diferencial da LA, tendo em vista, principalmente, as nossas condições ambientais propícias à manutenção do VLA.

Uma vez realizado o isolamento e a identificação do VLA, faz-se necessária a sorotipagem da cepa viral, que, embora seja um procedimento simples, em determinadas circunstâncias pode se tornar complicado, em função do grande número de sorotipos do VLA existentes e das reações cruzadas entre eles e os orbivírus relacionados.

O mesmo acontece com a sorotipagem, através da pesquisa de anticorpos em amostras de soros sanguíneo de animais suspeitos, que é de grande utilidade para a caracterização da doença³³ mas, devido à ocorrência de 24 sorotipos do VLA, torna-se obrigatória a preparação de 24 antígenos específicos, titulados e padronizados previamente com os antissoros correspondentes, limitando deste modo o número de amostras a serem analisadas por esta técnica¹⁴¹.

Um aspecto que também deve ser levado em conta é a seleção de amostras a serem submetidas à sorotipagem. TAYLOR e col., 1985¹⁶² têm conseguido uma

avaliação clara da epidemiologia da doença, examinando amostras de animais jovens, após a 1ª conversão sorológica. O projeto LA, desenvolvido pelo IICA, na Costa Rica e países do Caribe, segue este procedimento de coleta e tem conseguido a caracterização epidemiológica da doença, com isolamento viral e identificação de sorotipos (J.HOMAN, 1988 -comunicação pessoal).

O uso da sorotipagem em amostras de soro de animais adultos não é o procedimento mais adequado, visto que os animais podem ter sido infectados, a nível de campo, com mais de um sorotipo do VLA^{33.34.73}. Em consequência deste fato, e ainda da grande relação estrutural existente entre os orbivirus relacionados, e em função do uso de diferentes técnicas nos laboratórios que realizam este teste, cuidados especiais devem ser tomados com relação à interpretação dos resultados^{33.73.141}.

Animais infectados e/ou inoculados experimentalmente por mais de uma cepa viral podem apresentar anticorpos neutralizantes para cepas antigênicamente relacionadas. A explicação deste fenômeno é dada pela existência da imunidade heterotípica, descrita nesta enfermidade^{33.34.98.99.106.154.182}.

Na realidade, a caracterização sorológica da doença tem sido feita, mundialmente, através de testes sorogrupo-específicos, baseados principalmente nas reações de imunodifusão em gel de agar, de fixação do complemento e, com menor frequência, de imunofluorescência^{28.33.84.105}.

A IDGA tem sido a técnica mais usada, pela relativa facilidade, simplicidade, e reprodutibilidade, permitindo a análise de um grande número de amostras^{28.64.143}, apesar da desvantagem de apresentar baixa sensibilidade, interpretação subjetiva^{3.143}, principalmente quando da ocorrência de reação fraca ou fortemente positiva, da não aplicabilidade à quantificação de anticorpos e da necessidade de antígeno altamente concentrado^{4.24.44.84.101.147.174}.

Por outro lado o antígeno utilizado na IDGA apresenta a vantagem de conter epítopos comuns a todos os sorotipos do VLA, embora apresente, como já mencionado, reação cruzada com outros orbivírus, principalmente o VDEH^{104.105.135.136}.

Esta técnica é utilizada no diagnóstico rotineiro da LA em um grande número de países^{64.65.91.138.160}, e substituiu a FC nos EUA desde 1980, quando passou a ser usada para a seleção de animais destinados à exportação¹⁴³. Os trabalhos realizados no Brasil, até o momento, conforme referido anteriormente, foram feitos através desta reação^{12.44.45.46.47}.

A fixação do complemento é o segundo teste sorogrupo-específico mais utilizado no diagnóstico sorológico da LA^{24.31.143}. Pode ser utilizada, também, para a identificação viral, com antissoros específicos para os distintos sorotipos do VLA^{141.143.174}. Tem sido descrita como específica, sensível e de pouca reprodutibilidade por

causa do rápido desaparecimento de anticorpos, em geral da classe IgM, que são mais reativos em FC⁷² e a ocorrência de atividade anticomplementar em soros levemente contaminados e/ou hemolisados. Também o comportamento dos soros de ovinos, na opinião de vários autores^{4,31,174}, tem se constituído em uma limitação para a aplicação mais extensiva desta técnica.

Entre as técnicas sorogrupo-específicas, as imunoenzimáticas (EIE) vêm despontando com maior possibilidade de substituir a IDGA, no diagnóstico rotineiro da LA⁷⁴. Muitos autores têm se dedicado ao estudo desta técnica^{3,4,5,10,84,120}, utilizando antígenos purificados e semi-purificados, aliados ou não ao uso de anticorpos monoclonais.

AFSHAR e col., em 1987^{3,4} em estudos comparativos entre os testes de neutralização em placas, IDGA, e vários sistemas de EIE, detectaram, por EIE competitivo, em soros de ovinos, anticorpos mais precocemente, e títulos mais elevados, em comparação aos soros de bovinos. Estes mesmos autores encontraram, ainda, que geralmente a resposta imune humoral em ovinos era menos variável que em bovinos. Esta variação talvez possa ser explicada pela diferença na forma de apresentação da doença nestas duas espécies animais.

Em bovinos, a LA tem sido relacionada à hipersensibilidade tipo I, o que não acontece em ovinos^{8,97,128,154}, entretanto a detecção de LTc em

ovinos^{34.60.140.158} e a dificuldade em demonstração destes linfócitos em bovinos⁹⁷, o estado de tolerância imunológica e a viremia esporádica que têm sido descritos com maior frequência na espécie bovina^{81.82.115.116.124}, podem refletir sobre o comportamento da doença e talvez justificar as variações encontradas por AFSHAR e col., 1987⁴, na análise das amostras de soros mencionadas anteriormente.

Uma observação interessante, em bovinos, é a diferença de duração da viremia nesta espécie animal, em comparação à dos ovinos. Os bovinos permanecem virêmicos por vários meses, com presença simultânea ou não de partículas virais e anticorpos circulantes^{106.115.116.135.154.158}. O mecanismo específico para persistência não é conhecido. Em ovinos, há uma relação temporal entre o aparecimento de anticorpos neutralizantes e LTc com o subsequente declínio do vírus na circulação sanguínea, comprovando a importância destes anticorpos e destes linfócitos na eliminação dos antígenos virais^{60.61.97.106.124.140}.

As limitações na aplicação dos métodos de EIE no nosso meio estão relacionadas ao custo dos equipamentos necessários à preparação dos antígenos purificados, à obtenção de anticorpos monoclonais e, principalmente, ao custo do aparelho apropriado para leitura dos testes. A implementação desta técnica nos laboratórios do país seria importante para o diagnóstico da LA e de outras doenças dos animais, pelas diversas vantagens mencionadas pelos autores.

PINI e col., 1965¹⁴⁴ descreveram a imunofluorescência direta (IFD) como um teste que detecta reação grupo-específica para o VLA, e ressaltaram que a mesma não pode ser usada para diferenciação de cepas, sendo, entretanto, de grande utilidade para identificação rápida deste vírus, não levando em conta a variação imunológica. Esta técnica vem sendo considerada, pela maioria dos autores, como de maior utilidade para indicar a presença de antígenos do VLA ou do VDEH em tecidos animais de várias origens^{51.55.100.112.147.152}, mesmo quando não é possível o seu isolamento em sistemas sensíveis.

A imunofluorescência indireta (IFI) foi também descrita por PINI e col., 1968¹⁴⁵ para detectar e quantificar anticorpos anti-VLA em soros de ovinos, demonstrando que a mesma apresenta sensibilidade na detecção de infecções recentes e crônicas nesta espécie animal. Estes autores compararam a IFI com a neutralização, e verificaram resultados coincidentes entre as duas técnicas, na identificação de anticorpos entre o 7º e 11º dias e, em nível mais alto, na 4ª semana pós-infecção. JEENINGS e BOORMAN, 1980¹⁰⁰, no entanto, consideram a imunofluorescência uma técnica útil em experimentos envolvendo triagem de grande número de insetos suspeitos de infecção pelo VLA, porém não-quantificável, nem suficientemente sensível para ser usada em sistema de titulação, e recomendam a realização de um maior número de

trabalhos, para estabelecer a aplicabilidade do método ao uso rotineiro.

O uso do conjugado anti-espécie, que pode ser preparado pelo laboratório ou adquirido comercialmente, facilita a aplicação da técnica, e permite testar amostras de várias espécies animais com o mesmo substrato biológico de replicação viral, independentemente do sorotipo.

O padrão de fluorescência mais encontrado pelos autores^{82,100,152} é de aspecto granular, sob forma de pequenas partículas, com aparência uniforme em culturas de tecidos estabilizadas e com características individuais, próprias de cada órgão ou tecido animal, nos quais os antígenos do VLA estão localizados, não havendo relação entre o padrão e o sorotipo do vírus com o qual a célula foi infectada^{82,152}. ROY e col., 1985¹⁵¹, porém, trabalhando com conjugado marcado com fluoresceína e biotina na revelação de sondas moleculares, encontraram intensos sinais de fluorescência no nucléolo de células infectadas pelos sorotipos 10 e 11, e fluorescência dispersa no núcleo de células infectadas pelo sorotipo 13.

O padrão de fluorescência observado no presente estudo é compatível com o descrito na literatura, tendo ocorrido com maior intensidade na periferia do citoplasma e dispersão para regiões mais próximas do núcleo celular e, durante o exame dos soros, raramente se deu o aparecimento de fluorescência nucleolar e dispersão através do núcleo celular, informação não mencionada nos resultados.

Os resultados encontrados em IFI, no presente estudo, foram muito semelhantes aos obtidos em IDGA, com um grau de concordância de 92,63% para os soros de bovinos e de 90,28% para os de ovinos. A IFI apresentou, também, alta sensibilidade (S) e especificidade (E), quando comparadas com a técnica padrão de IDGA. A IFI apresenta a vantagem de ser quantitativa e de detectar antígenos do VLA em células infectadas. Esta técnica pode ser utilizada associada à IDGA, visto permitir a quantificação de anticorpos e rapidez de resultados, apresentando, inclusive, potencial para substituir a mesma, no diagnóstico sorológico da LA, desde que o laboratório disponha do equipamento apropriado para as leituras.

Deve-se salientar que a probabilidade de o animal, cujo soro foi considerado positivo, ser verdadeiramente positivo (VPR+) é de, aproximadamente, 92% para os soros bovinos e de 90% para os ovinos. Por outro lado, a verdadeira probabilidade, com relação ao resultado negativo (VPR-), é da ordem de 93%, para bovinos, e de 91% para ovinos.

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre a S, a E, o VPR+ e o VPR- da IFI, em relação à IDGA, quando foram utilizados soros bovinos e ovinos. Ressalta-se, ainda, que a medida que se aumenta o número de amostras analisado, a probabilidade de S e E serem maiores também aumenta, portanto, o tamanho

da amostra de soros de ovinos pode ter sido responsável pelas pequenas diferenças obtidas.

Os resultados encontrados permitem afirmar que a metodologia empregada na produção do antígeno solúvel, para uso em IDGA, poderá ser extensivamente utilizada, na prática, no país, para levantamentos epidemiológicos.

A utilização da IDGA e da IFI, isoladamente ou associadas, permitirá uma avaliação real e confiável da situação epidemiológica da língua azul em nosso meio. Além do emprego da IFI em levantamentos sorológicos, esta técnica apresenta a vantagem de permitir a identificação de antígenos virais específicos podendo possivelmente, no futuro, ser utilizada para confirmação de isolamento viral para posterior caracterização dos sorotipos do VLA atuantes a nível de campo e, permitir a adoção de medidas de controle da doença, inclusive avaliando a eficiência do uso de vacinas.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível chegar às seguintes conclusões:

5.1 O VLA-S4 adaptou-se facilmente às linhagens celulares BHK e VERO e as suspensões virulentas produzidas nas células VERO foram suficientes para possibilitar o estudo das partículas virais e a produção do antígeno solúvel.

5.2 A purificação das partículas virais permitiu o estudo detalhado do VLA-S4, através de ME e EGPA na análise do ARN e da proteína, possibilitando o acompanhamento das várias etapas de produção do antígeno solúvel (AS).

5.3 O método utilizado para a produção do AS mostrou-se reprodutível e forneceu bom rendimento; o AS, quando analisado comparativamente aos antígenos padrões do NADC e ao comercial (COM)/EUA, através de IDGA (teste de identidade) e EGPA (perfil protéico), mostrou identidade total e semelhança entre as bandas protéicas, respectivamente, sugerindo tratar-se de preparações antigênicas semelhantes.

5.4 A avaliação semi-quantitativa do AS, realizada através do teste de imunodifusão radial simples, comparativamente aos antígenos do NADC e ao COM, bem como a sua titulação em bloco, associada às conclusões mencionadas nos itens

anteriores, sugerem a possibilidade de obtenção do AS em larga escala e, conseqüentemente, a sua utilização em estudos epidemiológicos, através de IDGA.

5.5 O componente protéico do AS, identificado no presente estudo como a principal proteína responsável pela linha de precipitação formada em IDGA, apresentou PM $60,00 \times 10^3$ d, sugerindo tratar-se, provavelmente, da proteína NS1 (P5a) ou da VP5.

5.6 A IFI apresentou resultados muito semelhantes aos obtidos em IDGA, com alto grau de concordância, alta sensibilidade e especificidade, podendo fornecer uma avaliação real e confiável da situação epidemiológica da LA em nosso meio.

5.7 A IDGA e a IFI, conforme descritas no presente estudo, podem ser usadas, separadas ou conjuntamente, para o diagnóstico sorológico da LA.

5.8 A IFI pode ser também utilizada em estudos de identificação de antígenos virais em cultivos celulares infectados pelo VLA.

6 RESUMO

No presente estudo o vírus da língua azul-sorotipo 4 (VLA-S4) adaptado às linhagens celulares BHK-21, clone 13 e VERO apresentou efeito citopático característico entre 72 e 96 h pós-inoculação, com títulos que variaram entre $10^{3.8}$ a $10^{5.8}$ DICC 50%/ml. A partir do sedimento das células infectadas as partículas virais foram purificadas em ultracentrifugações em gradiente de CsCl, e apresentavam densidade de cerca de $1,38 \text{ g/cm}^3$. Ao microscópio eletrônico foram visualizadas partículas com forma aproximadamente esférica e diâmetro médio de $54,99 \pm 0,12 \text{ nm}$, correspondentes ao virion e de $49,68 \pm 0,08 \text{ nm}$, ao nucleocapsídeo. O perfil eletroforético do ARN do VLA-S4 mostrou a presença de dez segmentos com valores de PM $2,92 \times 10^6 \text{ d}$ (segmento 1) e $0,49 \times 10^6 \text{ d}$ (segmento 10) e o das proteínas, as sete proteínas estruturais -VP1 a VP7- com PM variando de $103,69 \times 10^3 \text{ d}$ (VP1) a $30,24 \times 10^3 \text{ d}$ (VP7). O antígeno solúvel (AS), produzido a partir do sobrenadante de culturas de células VERO infectadas pelo VLA e concentrado por ultrafiltração sequencial em membranas com CNL de 10.000 e 25.000, apresentou em teste de identidade com os antígenos do NADC e comercial (COM), uma única linha de precipitação, nítida e confluyente. Na análise do perfil eletroforético dos três antígenos observou-se um padrão muito semelhante, o que sugere que as três preparações antigênicas contém proteínas semelhantes. A avaliação semi-quantitativa deste antígeno em imunodifusão radial simples apresentou uma potência relativa

ligeiramente superior à do NADC e igual à do COM, e na titulação em bloco por imunodifusão dupla, título de uso 1/2, evidenciando-se que o AS poderia ser utilizado em provas rotineiras de IDGA, para o diagnóstico sorológico da LA. O componente protéico do AS, principal responsável pela linha de precipitação em IDGA, apresentou PM 60,00 x 10³ d, sugerindo tratar-se, provavelmente, da proteína NS1 (P5a) ou da VP5. A imunofluorescência indireta (IFI), executada em células VERO adicionadas de soros e conjugados anti-IgG de bovinos ou de ovinos, apresentou fluorescência intracitoplasmática, com aspecto granular, e em algumas células foi observada apenas na membrana celular. Foram testadas 190 amostras de soros sanguíneos de bovinos e 72 de ovinos, pelas técnicas de IDGA e IFI. Em IDGA obteve-se um total de 134 amostras positivas e 128 amostras negativas, enquanto que em IFI observou-se 137 amostras positivas e 125 negativas. A análise estatística destes dados registrou uma alta concordância para os soros de bovinos e para os soros de ovinos, entre as duas técnicas. Em IFI encontrou-se alta sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos resultados positivos e dos resultados negativos, em comparação com a IDGA, o que nos permite afirmar que as duas técnicas podem ser utilizadas na rotina laboratorial como instrumento para uma avaliação real da situação epidemiológica da LA no nosso meio. A IFI oferece a vantagem adicional da possibilidade de ser utilizada para detecção de antígenos virais em cultivos celulares inoculados pelo VLA.

7 ABSTRACT

In the present study a strain of Bluetongue virus, serotype 4 (BTV-S4), when adapted to BHK 21, clone 13 and to VERO cell lines has shown a distinctive cytopathic effect between 72 h and 96 h after inoculation, with titres ranging from $10^{3.6}$ to $10^{5.6}$ DICT 50%/ml. After a high speed centrifugation of the packed infected cells the viral particles were purified by ultracentrifugation using CsCl gradient, showing density around 1.38 g/cm^3 . In the electron microscope, two types of spherical particles were observed one with a mean diameter of $54.99 \pm 0.12 \text{ nm}$ corresponding to the virion and the other of $49.68 \pm 0.08 \text{ nm}$, corresponding to the nucleocapsid. The electrophoretic profiles of the RNA extracted from BTV-S4 showed ten segments with MW between $2.96 \times 10^6 \text{ d}$ (segment 1) to $0.49 \times 10^6 \text{ d}$ (segment 10). With regard to the structural proteins, the MW also varied from 103.69×10^3 (VP1) to 30.24×10^3 (VP7). The soluble antigen (SA) produced from culture supernatants of BTV-infected VERO cells and concentrated by sequential ultrafiltration with membranes with cut-off values 10.000 and 25.000, when compared with the antigens produced by the NADC and commercially, showed total identity by the agar gel immunodiffusion (AGID) test forming a nitid and confluent precipitation line without any spur. The electrophoretic protein profile of the 3 antigens was quite similar suggesting an identical antigen preparation. A semi-quantitative evaluation of this antigen by single radial

immune diffusion test showed a relative potency slightly higher than the NADC and equal to the commercial one. Furthermore checking block titration revealed that routine dilution of this antigen to be used in AGID for the serological diagnosis of BT should be 1/2. The proteic component of the AS, main responsible for the IDGA reaction, showed a MW around 60.00×10^3 d suggesting that this might be, probably, the NS1 (P5a) protein or the VP5. The indirect immunofluorescent technique (IIFT) carried out with BTV-infected VERO cells using bovine and ovine sera and anti-IgG conjugates showed a granular intracytoplasmatic fluorescence and in some cells this fluorescence was observed only on cellular membranes. Sera from 190 bovine and 72 ovine were examined by AGID and IIFT. In the AGID 134 samples were positive for BTV antibodies and 128 were negative, whereas in the IIFT 137 sera were positive for BTV antibodies and 125 were negative. Statistical analysis of these data showed close agreement between the two techniques, regardless of the kind of sera examined. In the IIFT, high sensitivity, specificity and predictable values for positive and negative results were found compared with the IDGA, which means, that both techniques can routinely be used in epidemiologic evaluation studies of BT in our country. The IIFT offers an additional advantage as it may be used to detect viral antigens in BT-infected cell lines.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 ADAMS, D. S.; GOGOLEWSKI, R.P.; BARBET, A. F.; CHEEVERS, W. P. Identification of caprine arthritis-encephalitis retrovirus proteins in immunodiffusion precipitin lines. *J. gen. Virol.*, 66: 1139-43, 1985.
- 2 ADKISON, M. A.; STOTT, J.L.; OSBURN, B.I. Identification of bluetongue virus protein-specific antibody responses in sheep by immunoblotting. *Am. J. vet. Res.*, 48(8): 1194-8, 1987.
- 3 AFSHAR, A.; THOMAS, F.C.; WRIGHT, P.F.; SHAPIRO, J. L.; ANDERSON, J.; FULTON, R. W. Blocking dot-ELISA using a monoclonal antibody for detection of antibodies to bluetongue virus in bovine and ovine sera. *J. Virol. Meth.*, 18: 271-80, 1987.
- 4 AFSHAR, A.; THOMAS, F. C.; WRIGHT, P.F.; SHAPIRO, J. L.; SHETTIGARA, P. T.; ANDERSON, J. Comparison of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. *J. clin. Microb.*, 25(9): 1705-10, 1987.
- 5 AFSHAR, A.; THOMAS, F. C.; WRIGHT, P.F.; SHAPIRO, J. L.; ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 124: 136-41, 1989.

- 6 AKEY, D. & McKINNON, C. The Riddle of bluetongue. *Agric. Res. U.S.D.A. Sci. Educ. Adm.*, 28: 4-9, 1980.
- 7 ALONSO FERNANDEZ, A. & SONDAHL, M. S. Caracterización antigenica e imunogenica de várias cepas del serotipo indiana de estomatite vesicular aisladas en Brasil. *Bltn. C.P.F.A.*, 51: 23-6, 1985.
- 8 ANDERSON, G.A. Pathology and pathogenesis of experimental bluetongue disease in cattle. *Diss. abstr. Int.*, 46 (2): 364B, 1985.
- 9 ANDERSON, G. A.; STOTT, J. L.; GERSHWIN, L. J.; OSBURN, B. I. Subclinical and clinical bluetongue disease in cattle: clinical, pathological and pathogenic considerations. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 103-107.
- 10 ANDERSON, J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immun. Meth.*, 74: 139-40, 1984.
- 11 APPLETON, J. A. & LETCHWORTH, G. J. Monoclonal antibody analysis of serotype-restricted and unrestricted bluetongue viral antigenic determinants. *Virology*, 124: 286-99, 1983.
- 12 ARITA, G. M. M. & DEAK, J. G. Diagnóstico da língua azul e orbivírus relacionados no Laboratório Regional de Apoio Animal - Campinas/SP, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 55 (Supl.): 49, 1988

- 13 BARBER, T. L. & COLLISSON, E. W. Implications of a new bluetongue serotype for the U. S. livestock industry. In: **Proceedings of Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, 87., Las Vegas, NE., 1983. p. 90-104.
- 14 BARBER, T. L. & JONES, R. H. Bluetongue virus, serotype 2: vector transmission and pathogenicity for sheep. In: **Proceedings of Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, 88., Las Vegas, NE., 1984. p. 545-551.
- 15 BARNARD, B. J. H. & PIENAAR, J. G. Bluetongue virus as a cause of hidranencephaly in cattle. **Onderstepoort J. vet. Res.**, 43(3): 155-8, 1976.
- 16 BARRADAS, M. M. Caracterização do vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) e sua identificação como um *Tymovirus*. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo - SP, 1983.
- 17 BARTH, O. M. Estudos sobre a contrastação negativa de suspensões virais. **Revta. bras. Biol.**, 44(1): 71-80, 1984.
- 18 BARTH, O. M. The Use of Polylysine during negative staining of viral suspensions. **J. Virol. Meth.**, 11: 23-7, 1985
- 19 BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. de; GOTLIEB, S. L. D. In: _ _ _ _ _ **Bioestatística**. São Paulo, Pedagógica e Universitária, 1981. p. 47-67.

- 20 BIER, O. G.; MOTA, I.; DA SILVA, W. D.; VAZ, N. M. A interação antígeno - anticorpo. In: _ _ _ _ _ . *Imunologia Básica e Aplicada*. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p. 171-233.
- 21 BLANCHAR-CHANNEL, M. & STOTT, J. L. Bluetongue virus propagation and plaque assay: variation due to medium and serum supplement. *J. Virol. Meth.*, 24: 265-71, 1989.
- 22 BLUE, J. L.; DAWE, D. L.; GRATZEK, J. B. The use of passive hemagglutination for the detection of bluetongue viral antibodies. *Am. J. vet. Res.*, 35(1): 139-42, 1974.
- 23 BOTH, G. W.; BELLAMY, A. R.; STREET, J. E.; SIEGMAN, L. J. A general strategy for cloning double-stranded RNA: nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene 8. *Nucl. Ac. Res.*, 10(22): 7075-87, 1982.
- 24 BOULANGER, P. & FRANK, J. F. Serological methods in the diagnosis of bluetongue. *Aust. vet. J.*, 51: 185-9, 1975.
- 25 BOWEN, R. A. Infection of early mammalian embryos with bluetongue virus. *Diss. abst. Int.*, 44(8): 2354B, 1984.
- 26 BOWEN, R. A. & HOWARD, T. H. Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus-containing bovine semen. *Am. J. vet. Res.*, 45(7): 1386-8, 1984.

- 27 BOWNE, J. G.; LUEDKE, A. J.; FOSTER, N. M.; JOCHIM, M. M. Current aspects of bluetongue in cattle. *J.A.V.M.A.*, 148(10): 1177-80, 1966.
- 28 BOWNE, J. G.; LUEDKE, A. J.; JOCHIM, M. M.; METCALF, H. E. Bluetongue disease in cattle. *J.A.V.M.A.*, 153(6): 662-8, 1968.
- 29 BOWNE, J.G. & RITCHIE, A. E. Some morphological features of bluetongue virus. *Virology*, 40: 903-11, 1970.
- 30 BOUVET, J. P.; PIRES, R.; PILLOT, J. A modified gel filtration technique producing an unusual exclusion volume of IgM: A simple way of preparing monoclonal IgM. *J. Immun. Meth.*, 66: 299-305, 1984.
- 31 BRECKON, R. D.; LUEDKE, A. J.; WALTON, T. E. Bluetongue virus in bovine semen: viral isolation. *Am. J. vet. Res.*, 41(3): 439-42, 1980.
- 32 BRUNER, R. & VINOGRAD, J. The Evaluation of standard sedimentation coefficients of sodium RNA and sodium DNA from sedimentation velocity data in concentrated NaCl and CsCl solutions. *Bioch. Bioph. Acta.*, 108: 18-29, 1965.
- 33 CAMPBELL, C. H. Bluetongue Diagnostic/antigenic interpretation. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 435-443.
- 34 CAMPBELL, C. H. & GRUBMAN, M. J. Current knowledge on the biochemistry and immunology of bluetongue. *Prog. vet. Microbiol. Immun.*, 1: 58-79, 1985.

- 35 CARRIER, S. P. & BOULANGER, P. Improvements in the modified direct complement fixation test and its application in the detection of bluetongue antibodies in cattle and sheep sera. *Can. J. Comp. Med.*, 39: 231-3, 1975.
- 36 CASTRO, A. E. & RODGERS, S. J. Congenital anomalies in cattle associated with an epizootic of bluetongue virus (Serotype II). *Bov. Pract.*, 19: 87-91, 1984.
- 37 CASTRO, A. E.; MONTAGUE, S. R.; DOTSON, J. F.; DeFORGE, J. R. Susceptibility of a fetal tongue cell line derived from bighorn sheep to five serotypes of bluetongue virus and its potential for the isolation of viruses. *J. vet. Diagn. Invest.*, 1: 247-53, 1989.
- 38 CHERRINGTON, J. M.; GHALIB, H. W.; SAWYER, M. M.; OSBURN, B. I. Detection of viral antigens in bluetongue virus infected ovine tissues, using the peroxidase-antiperoxidase technique. *Am. J. vet. Res.*, 46(11): 2356-9, 1985
- 39 COLLISSON, E. W. & BARBER, T. L. Isolation and identification of bluetongue virus: a serotype new to the U. S. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 319-327.
- 40 Comisión Mexico - Estados Unidos para la Prevención de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales. Epidemiología de la lengua azul en Centro America y el Caribe. *Boletín* 3(1): 33-4, 1990.

- 41 COWLEY, J. A. & GORMAN, B. M. Genetic reassortants for the identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. *J. Virol.*, 61: 2304-6, 1987.
- 42 COWLEY, J. A. & GORMAN, B. M. Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. *Vet. Microb.*, 19: 37-51, 1989.
- 43 CROMACK, A. S.; BLUE, J. L.; GRATZEK, J. B. A Quantitative ultrastructural study of the development of bluetongue virus in Madin-Darby Bovine Kidney cells. *J. gen. Virol.*, 13: 229-44, 1971.
- 44 CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A. C. Anticorpos precipitantes para o vírus da língua azul em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Biológico*, 48(4): 99-103, 1982.
- 45 CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; PASSOS, W. S. Anticorpos para o vírus da língua azul em soros de bovinos dos Estados de São Paulo e da Região Sul do Brasil. *Rev. bras. Med. Vet.*, 9(6): 121-4, 1987.
- 46 CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A. C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Arg. Flum. Med. Vet.*, 3(2): 53-6, 1988.
- 47 DEAK, J. G. & ARITA, G. M. M. Detecção de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de antílopes importados. *Biológico*, 49(7): 195-6, 1983.

- 48 DEAK, J. G., ARITA, G. M. M.; PRUDENCIO, C. N.
Estomatite vesicular no Estado de Minas Gerais, Brasil
(Nota Prévia). *Rev. bras. Med. Vet.*, 9(1): 17-9, 1987.
- 49 DELLA-PORTA, A. J.; MCPHEE, D. A.; PARSONSON, I. M.;
SNOWDON, W. A. Classification of the orbiviruses,
confusion in the use of terms bluetongue virus,
bluetongue like-virus, bluetongue-related virus and
the overall nomenclature. *Aust. vet. J.*, 58: 164,
1982.
- 50 DELLA-PORTA, A. J.; PARSONSON, I. M.; MCPHEE, D. A.
Problems in the interpretation of diagnostic tests due
to cross-reactions between orbiviruses and broad
serological responses in animals. In: Barber Jochim.
Bluetongue and Related Orbiviruses. New York, Alan R.
Liss., 1985, p. 445 - 453.
- 51 EATON, B. T.; HYATT, A. D.; WHITE, J. R. Association of
bluetongue virus with the cytoskeleton. *Virology*, 157:
107-16, 1987.
- 52 EATON, T. B.; HYATT, A. D.; WHITE, J. R. Localization of
the nonstructural protein NS1 in bluetongue virus-
infected cells and its presence in virus particles.
Virology, 163: 527-37, 1988.
- 53 ELS, H. J. & VERWOERD, D. W. Morfology of bluetongue
virus. *Virology*, 38: 213-9, 1969.

- 54 Emergency Programs United States Department of Agriculture. Central American and Caribbean bluetongue epidemiology, 1989 p.6 (Foreign Animal Disease Report, 17-3.).
- 55 ENRIGHT, F. M. & OSBURN, B. I. Ontogeny of host responses in ovine fetuses infected with bluetongue virus. *Am. J. vet. Res.*, 41(2): 224-9, 1980.
- 56 ESTES, M. K. & COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*, 53(4): 410-49, 1989.
- 57 FERREIRA, M. E. V. Prueba de microneutralizacion para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Bltn. C.P.F.A.*, 21-22: 17-20, 1974.
- 58 FOSTER, N.M. & LUEDKE, A. J. Direct assay for bluetongue virus by intravascular inoculation of embrionating chicken eggs. *Am. J. vet. Res.*, 29(3): 749-53, 1968.
- 59 FULTON, R. W. & PEARSON, N. J. Interferon induction in bovine and feline monolayer cultures by four bluetongue virus serotypes. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 100-2, 1982.
- 60 GHALIB, H. W. Bluetongue virus in sheep: infection and immunity. *Diss. abst. Int.*, 44(10): 2945B-6B, 1984.
- 61 GHALIB, H. W.; SCHORE, C. E.; OSBURN, B. I. Immune response of sheep to bluetongue virus: *in vitro* induced lymphocyte blastogenesis. *Vet. Immun. Immunop.*, 10: 177-88, 1985.

- 62 GHIASI, H.; PURDY, M. A.; ROY, P. The complete sequence of bluetongue virus serotype 10 segment 3 and its predicted VP3 polypeptide compared with those of BTV serotype 17. *Vir. Res.*, 3: 181-90, 1985.
- 63 GIBBS, E. P. J. Bluetongue - An analysis of current problems, with particular reference to importation of ruminants to the United States. *J.A.V.M.A.*, 182(11): 1190-4, 1983.
- 64 GIBBS, E. P. J.; GREINER, E. C.; ALEXANDER, F. C. M.; KING, T. H.; ROACH, C. J. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. *Vet. Rec.*, 113: 446-8, 1983.
- 65 GIBBS, E. P. J. ; GREINER, E. C.; TAYLOR, W. P.; BARBER, T. L.; HOUSE, J. A.; PEARSON, J. E. Isolation of Bluetongue virus serotype 2 from cattle in Florida: serotype of bluetongue virus hitherto unrecognized in the Western Hemisphere. *Am. J. vet. Res.*, 44(12): 2226-8, 1983.
- 66 GOLDSMIT, L. & BARZILAI, E. Isolation and propagation of bluetongue virus in embrionating chicken eggs. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss. Inc., 1985. p. 307-318.
- 67 GORMAN, B. M. Variation in orbiviruses. *J. gen. Virol.*, 44: 1-15, 1979.

- 68 GORMAN, B. M.; TAYLOR, J.; WALKER, P. J.; DAVIDSON, W. L.; BROWN, F. Comparison of bluetongue type 20 with certain viruses of the bluetongue and eubenberg serological groups of orbiviruses. *J. gen. Virol.*, 57: 251-61, 1981.
- 69 GORMAN, B. M. Evolucionary relationships among Orbiviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 5(2): 323-32, 1986.
- 70 GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; EATON, B. T. Morfogenesis of a bluetongue virus variant with an amino acid alteration at a neutralization site in the outer coat protein, VP2. *Virology*, 165: 23-32, 1988.
- 71 GREINER, E. C.; GARRIS, G. I.; ROLLO, R. T. KNAUSENBERGER, W. I.; JONES, J. E.; GIBBS, E. J. Preliminary studies on the *Culicoides spp* as potential vectors of bluetongue in the Caribbean Region. *Prev. Vet. Med.*, 2: 389-99, 1984.
- 72 GRIMES, J. E. & McCONNEL, S. Immunodiffusion test antigen from bluetongue virus-infected newborn mouse brains. *Vet. Microb.*, 8: 363-72, 1983.
- 73 GROOCKOCK, C. M. & CAMPBELL, C. H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarentine. *Can. J. comp. Med.*, 46: 160-4, 1982.
- 74 GUMM, I. D. & NEWMAN, J. F. E. The Preparation of purified bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. *Arch. Virol.*, 72: 83-93, 1982.

- 75 GUMM, I. D.; TAYLOR, W. P.; ROACH, C. J.; ALEXANDER, F. C. M.; GREINER, E. C.; GIBBS, E. P. J. Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. *Vet. Rec.*, 114: 635-638, 1984.
- 76 HAIG, D.A.; MCKERCHER, D. G.; ALEXANDER, R. A. The cytopathogenic action of bluetongue virus on tissue cultures and its application to the detection of antibodies in the serum of sheep. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 27(2): 171-7, 1956.
- 77 HARDWICKE, A. C. S. La lengua azul. *Vet. Mex.*, 11: 75-81, 1980.
- 78 HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. clin. Microb.*, 16(3): 473-7, 1982.
- 79 HIRASAWA, T. & ROY, P. The complete nucleotide sequence of VP5 of a strain of bluetongue virus of serotype 2 isolated in the USA reveals its close relationship with a virus of serotype 1 isolated in Australia. *Vir. Res.*, 15: 107-12, 1990.
- 80 HOMAN, E. J.; RUIZ, H. L. de; DONATO, A. P.; TAYLOR, W. P.; YUILL, T. M. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Costa Rica and Northern Colombia. *J. Hyg. Camb.*, 94: 357-63, 1985.

- 81 HOMAN, E. J.; TAYLOR, W. P.; RUIZ, H. L. de; YUILL, T. M. Bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease of deer virus serotypes in Northern Colombian cattle. *J. Hyg. Camb.*, 95: 165-178, 1986.
- 82 HOWARD, T. H. The pathogenesis of blue tongue in the bull. Tese (doutorado). Department of Physiology and Biophysics, Colorado State University, Colorado/USA, 1982.
- 83 HOWELL, P. G. & VERWOERD, D. W. *Bluetongue Virus*. In: New York, Springer - Verlag, 1971. 74 p. (Virology Monographs, N. 9).
- 84 HUBSCHLE, O. J. B.; LORENZ, R. J.; MATHEKA, H. D. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies. *Am. J. vet. Res.*, 42(1): 61-5, 1981.
- 85 HUBSCHLE, O. J. B. & YANG, C. Immunodiffusion studies with bluetongue virus using an isolated core protein. In: Proceedings of American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians, 26., 1983. p. 725-730.
- 86 HUDSON, L. & HAY, F. C. Isolation and structure of immunoglobulins. In: _ _ _ _ _ *Practical Immunology*. New York, Blackwell Scientific, 1985. p. 156-187.
- 87 HUISMANS, H. Protein synthesis in bluetongue virus-infected cells. *Virology*, 92: 385-96, 1979.

- 88 HUISMANS, H.; BREMER, C. W.; BARBER, T. L. The nucleic acid and proteins of epizootic haemorrhagic disease. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 46: 95-104, 1979.
- 89 HUISMANS, H. & ELS, H. J. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*, 92: 397-406, 1979.
- 90 HUISMANS, H. & BREMER, C. W. A Comparison of an australian bluetongue virus isolate (CSIRO 19) with other bluetongue virus serotypes by cross-hybridization and cross-immune precipitation. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 48: 59-67, 1981.
- 91 HUISMANS, H. & ERASMUS, B. J. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 48: 51-8, 1981.
- 92 HUISMANS, H. & CLOETE, M. A Comparison of different cloned bluetongue virus genome segments as probes for the detection of virus-specified RNA. *Virology*, 158: 373-80, 1987.
- 93 HYATT, A. D. & EATON, B. T. Ultrastructural distribution of the major capsid proteins within bluetongue virus and infected cells. *J. gen. Virol.*, 69: 805-15, 1988.
- 94 IICA. Informe de los Resultados de la Reunión Extraordinaria sobre Lengua Azul, Montevideo, Uruguay, 1987. p.1-5 (Labsur, 5).

- 95 INUMARU, S.; GHIASI, H.; ROY, P. Expression of bluetongue virus group-specific antigen VP3 in insect cells by a baculovirus vector: its use for the detection of bluetongue virus antibodies. *J. gen. Virol.*, 68: 1627-35, 1987.
- 96 JEGGO, M. H. & WARDLEY, R. C. The induction of murine cytotoxic T lymphocytes by Bluetongue Virus. *Arch. Virol.*, 71: 197-206, 1982.
- 97 JEGGO, M. H.; WARDLEY, R. C.; BROWLIE, J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 477 - 487.
- 98 JEGGO, M. H. A review of the immune response to bluetongue virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 5(2): 357-62, 1986.
- 99 JENICEK, M. & CLERAUX, R. In: _ _ _ _ _ . *Epidémiologie: Principes, Techniques, Applications*. Paris, Edisem, 1983. p. 27-41.
- 100 JENNINGS, M. & BOORMAN, J. Use of the indirect fluorescent antibody technique for the detection of bluetongue virus antigen in tissue smears from *Culicoides Variipennis* (Diptera Ceratopogonidae). *Vet. Microb.*, 5: 13-8, 1980.
- 101 JOCHIM, M. M. & CHOW, T. L. Immunodiffusion of bluetongue virus. *Am. J. vet. Res.*, 30(1): 33-41, 1969.

- 102 JOCHIM, M. M. Improvement of the AGP test for bluetongue. In: **Proceedings of Annual Meeting of the American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians**, 19., 1976. p. 361-376.
- 103 JOCHIM, M. M. & PEARSON, J. E. Protocol for the immunodiffusion test for bluetongue. In: **Proceedings of Annual Meeting of the American Association Veterinary Laboratory Diagnosticians**, 22., 463-471.
- 104 JOCHIM, M. M. & JONES, S. C. Evaluation of a hemolysis-in-gel test for detection and quantitation of antibodies to bluetongue virus. **Am. J. vet. Res.**, 41(4): 595-9, 1980.
- 105 JOCHIM, M. M. An overview of diagnostics for bluetongue. In: Barber Jochim. **Bluetongue and Related Orbiviruses**. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 423-433.
- 106 JOCHIM, M. M. Bluetongue: A review of the immune response of sheep and cattle to bluetongue virus infection. In: Barber Jochim. **Bluetongue and Related Orbiviruses**. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 455-460.
- 107 KLONTZ, G. W.; SVEHAG, S. E.; GORHAN, J. R. A study by the agar diffusion technique of precipitating antibody Directed against Blue tongue Virus and Its relation to hemotypic neutralizing antibody. **Arch. Virusforsch.**, 2: 259-72, 1962.

- 108 KNUDSON, D.L. & SHOPE, R.E. Overview of the orbiviruses.
In: Barber Jochim. **Bluetongue and Related Orbiviruses**.
New York, Alan R. Liss., 1985. p. 255-266.
- 109 KOWALIK, T. F. & LI, J. K. K. The genetic relatedness of
United States prototype bluetongue viruses by RNA/RNA
hibridization. **Virology**, 158: 276-84, 1987.
- 110 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during
the assembly of the head of bacteriophage T4. **NATURE**,
227: 680-5, 1970
- 111 LEWIS, S. A. & GRUBMAN, M. J. Bluetongue virus: surface
exposure of VP7. **Vir. Res.**, 16: 7-26, 1990.
- 112 LIENDO, G. & CASTRO, A. E. Bluetongue in cattle:
diagnosis and virus isolation. **Bov. Pract.**, 16: 87-95,
1981.
- 113 LIMA, A. O. & SILVA, W. S. da. In: **Imunologia,**
Imunopatologia, Alergia: Métodos. Rio de Janeiro,
Guanabara Koogan, 1970. 670 p.
- 114 LIVINGSTON, C. W. & MOORE, R. W. Cytochemical changes of
bluetongue virus in tissue cultures. **Am. J. vet. Res.**,
23(95): 701-10, 1972.
- 115 LUEDKE, A. J.; JOCHIM, M. M.; BOWNE J. G.; JONES, R. H.
Observations on latent bluetongue virus infection in
cattle. **J.A.V.M.A.**, 156(12): 1871-9, 1970.
- 116 LUEDKE, A. J. & WALTON, T. E. Effect of natural breeding
of heifers to a bluetongue virus carrier bull. **Bov.**
Pract., 16: 96-100, 1981.

- 117 LUEDKE, A. J. & JONES, R. H. Bluetongue: Diagnosis and significance in the bovine animal. *Bov. Pract.*, 19: 79-86, 1984.
- 118 LUEDKE, A. J. Effect of bluetongue virus on reproduction in sheep and cattle. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 71-78.
- 119 LUEDKE, A. J.; ERASMUS, B. J.; GOLDSMITH, L.; METCALF, H. E.; PEARSON, J. E.; SAWYER, M.; St. GEORGE, T.D.; STOTT, J. L.; TAYLOR, W. P. WHO/FAO Working team report: Virology. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss, 1985. p. 665-688.
- 120 LUNT, R. A.; WHITE, J. R.; BLACKSELL, S. D. Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. gen. Virol.*, 69: 2729-40, 1988.
- 121 MacLACHLAN, N. J. & OSBURN, B. I. Bluetongue virus induced hydranencephaly in cattle. *Vet. Pathol.*, 20: 563-73, 1983.
- 122 MacLACHLAN, N. J.; OSBURN, B. I.; GHALIB, H. W.; STOTT, J. L. Bluetongue virus-induced encephalopathy in fetal cattle. *Vet. Pathol.*, 22: 415-7, 1985.
- 123 MacLACHLAN, N. J. & THOMPSON, J. Bluetongue virus induced interferon in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 46(6): 1238-41, 1985.

- 124 MacLACHLAN, N. J.; HEIDNER, H. W.; FULLER, F. J. Humoral immune response of calves to bluetongue virus infection. *Am. J. vet. Res.*, 48(7): 1031-5, 1987.
- 125 MackPHERSON, I. & STOKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16(2): 147-51, 1962.
- 126 MAHRT, C. R. Bluetongue virus infection of sheep: effect of prior immunization on clinical, immunological and pathological responses. *Diss. abst. Int.*, 45(8): 2507B, 1985.
- 127 MARSHALL, J. A.; ROY, P. High level expression of the two outer capsid proteins of bluetongue virus serotype 10: their relationship with neutralization of virus infection. *Vir. Res.*, 15: 189-96, 1990.
- 128 MARTIN, S. A. & ZWEERINK, H. J. Isolation and characterization of two types of bluetongue virus particles. *Virology*, 50: 495-506, 1972.
- 129 MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 17 (1 - 3): 1-199, 1982.
- 130 McPHEE, D. A.; PARSONSON, I. M.; DELLA-PORTA, A. J. Comparative studies on the growth of Australian bluetongue virus serotypes in continuous cell lines and embryonated chicken eggs. *Vet. Microb.*, 7: 401-10, 1982.

- 131 MECHAM, J. D.; DEAN, C. V.; JOCHIM, M. M. Correlation of serotype specificity and protein structure of the five U.S. serotypes of bluetongue virus. *J. gen. Virol.*, 67: 2617-24, 1986.
- 132 MECHAM, J. D.; DEAN, V. C.; WIGINGTON, J. G.; NUNAMAKER, R. A. Detection of bluetongue virus in *Culicoides variipennis* (Diptera Ceratopogonidae) by an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Entomol.*, 27(4): 602-6, 1990.
- 133 MERTENS, P. P. C.; BROWN, F.; SANGAR, D. V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology*, 135: 207-17, 1984.
- 134 MERTENS, P. P. C.; BURROUGHS, J. N.; ANDERSON, J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology*, 157: 375-86, 1987.
- 135 METCALF, H. E. & LUEDKE, A. J. Bluetongue and related diseases. *Bov. Pract.*, 15: 188-93, 1980.
- 136 OBDEYN, I. M. Bluetongue: a review of the disease. Rio de Janeiro, Pan American FMD Center, 1987. p. 59 (Scientific and Technical Monographs Series, n.16).
- 137 OBERST, R. D.; STOTT, J. L.; BLANCHARD-CHANNEL, M.; OSBURN, B. I. Genetic reassortment of bluetongue virus serotype 11 strains in the bovine. *Vet. Microb.*, 15: 11-8, 1987

- 138 OELLERMANN, R. A.; CARTER, P.; MARX, M. J. Kinetics of the IgM and IgG immunological response to sheep erythrocytes and bluetongue virus in mice. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 43(4): 185-8, 1976.
- 139 OSBURN, B. I.; STOTT, J. L.; BOSWELL, E. J. A procedure for certifying germplasm and animals free of bluetongue virus infection. In: *Proceedings of Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 87., Las Vegas, NE., 1983. p. 105-110.
- 140 OSBURN, B. I. Role of the immune system in bluetongue host-viral interactions. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss., 1985. p. 417-422.
- 141 OZAWA, Y. & GRIFFITHS, R. B. Bluetongue a silently spreading disease. *Bull. Off. int. Epiz.*, 92(7-8): 593-600, 1980.
- 142 PEARSON, J. E.; CABREY, E.A.; GUSTAFSON, G.A. Bluetongue virus in cattle: complement fixing antibody response and viremia in experimentally infected animals. In: *Proceedings of Annual meeting of the United States Animal Health Association*, 77., Las Vegas, NE., 1973. p. 14-19.
- 143 PEARSON, J.E.; CABREY, E.A.; GUSTAFSON, G.A. Bluetongue and related orbiviruses diagnosis in the United States. In: Barber Jochim. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York, Alan R. Liss, 1985. p. 469-475.

- 144 PINI, A.; COACKLEY, W.; OHDER, H. Concentration of bluetongue virus in experimentally infected sheep and virus identification by immune fluorescence technique. *Arch. Virusforsch.*, 4: 385-90, 1965.
- 145 PINI, A.; COACKLEY, W.; OHDER, H. The Adverse effect of some calf sera on the isolation and propagation of bluetongue virus in tissue culture. *Arch. Virusforsch.*, 18: 88-95, 1966.
- 146 PINI, A.; OHDER, H.; WHITELAND, A. P.; LUND, L. J. Studies on the fluorescent and neutralizing antibodies to bluetongue virus in sheep. *Arch. Virusforsch.*, 25: 129-36, 1968.
- 147 PINI, A. A study on the pathogenesis of bluetongue: replication of the virus in the organs of infected sheep. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 43(4): 159-64, 1976.
- 148 RANGER, C. R. & BROWN, G. M. Bluetongue/epizootic haemorrhagic disease agar gel immunodiffusion (AGID) antigen. *NVSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-63/94*, 1984. p.1-4.
- 149 RANGER, C. R. & BROWN, G. M. Fluorescein isothiocyanate conjugated antiserum, bovine origin. *NVSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-83*, 1985. p.1-8.
- 150 REED, L. J. & MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-7, 1938.

- 151 ROY, P.; RITTER Jr., G. D.; AKASHI, H.; COLISSON, E.; INABA, Y. A genetic probe for identifying bluetongue virus infections *in vivo* and *in vitro*. *J. gen. Virol.*, 66: 1613-9, 1985.
- 152 RUCKERBAUER, G. M.; GRAY, D. P.; GIRARD, A.; BANNISTER, G. L.; BOULANGER, P. Studies on bluetongue V: detection of the virus in infected materials by immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 31: 175-81, 1967
- 153 SCHUDEL, A. A. Detection de la lengua azul. In: Trabajos Presentados Durante Labsur, 5., Santiago, Chile, 1986. p.5-12 (Série Salud Animal, Publicação Científica n.14).
- 154 SCHULTZ, K. T.; GREIDER, F. B. Immunobiology of bluetongue virus. *Vet. Immun. Immunop.*, 15: 115-27, 1987.
- 155 SQUIRE, K. R. E.; OSBURN, B. I.; CHUANG, R. Y.; DOI, R. H. A survey of the electropherotype relationship of bluetongue virus isolates from the Western United States. *J. gen. Virol.*, 64: 2103-15, 1983.
- 156 SQUIRE, K. R. E.; STOTT, J. L.; DANGLER, C. A.; OSBURN, B. I. Application of molecular techniques to the diagnosis of bluetongue virus infection. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.*, 3: 235-50, 1987.

- 157 STOTT, J. L.; ANDERSON, G. A.; JOCHIM, M. M.; BARBER, T. L.; OSBURN, B. I. Clinical Expression of bluetongue disease in cattle. In: **Proceedings of Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 88.**, Las Vegas, NE., 1984. p.126-131.
- 158 STOTT, J. L.; BARBER, T. L.; OSBURN, B. I. Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. **Am. J. vet. Res.**, 46(5): 1043-9, 1985.
- 159 TAKAMATSU, H.; JEGGO, M. H. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. **Immunology**, 66: 258-63, 1989.
- 160 TAMAYO, R.; SCHOEBITZ, R.; BOLDT, F. Evidencia serológica de lengua azul (bluetongue) en ovinos de la Décima Región de Chile. **Rev. Microbiol.**, 18(2): 131-5, 1987.
- 161 TAYLOR, W. P. The epidemiology of bluetongue. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 5(2): 351-6, 1986.
- 162 TAYLOR, W. P.; GUMM, I. D.; GIBBS, E. P. J.; HOMAN, J. The use of serology in bluetongue epidemiology. In: Barber Jochim. **Bluetongue and Related Orbiviruses**. New York, Alan R. Liss., 1985, p. 461-468.

- 163 The animal health and disease control position of the United States of America. Reported presented by the U. S. Delegation. XLVIIIe. Session generale, Rapport No. 3.10. Bull. Off. int. Epiz., 92(7-8): 659-76, 1980.
- 164 THOMAS, F. C.; SAMAGH, B.S.A Rapid plaque neutralization test for bluetongue virus. Can. J. comp. Med., 43: 234-6, 1979.
- 165 THOMAS, F. C.; RANDALL, G. C.; MYERS, D. J. Attempts to establish congenital bluetongue virus infections in calves. Can. J. vet. Res., 50: 280-1, 1986.
- 166 TIZARD, I. Detecção e medida da resposta imunitária humoral. In: _ _ _ _ _ Introdução a Imunologia Veterinária. 2.. ed. São Paulo, Roca, 1985. p. 112-143.
- 167 UNGER, R. E.; CHUANG, R. Y.; CHUANG, L. F.; OSBURN, B. I.; DOI, R. H. Colony hibridizations using nylon membranes and RNA probes - an improved method for screening bacterial clones containig bluetongue virus genome. J. Virol. Meth., 20: 251-64, 1988.
- 168 VAN DER WALT, N. T. A haemagglutination and haemagglutination inhibition test for bluetongue virus. Onderstepoort J. vet. Res., 47: 113-7, 1980.
- 169 VAN DIJK, A. A. & HUISMANS, H. The *in vitro* activation and further characterization of the bluetongue virus-associated transcriptase. Virology, 104: 347-56, 1980.

- 170 VERWOERD, D. W. Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology*, 38: 203-12, 1969.
- 171 VERWOERD, D. W. & HUISMANS, H. Studies on the *in vitro* and the *in vivo* transcription of the bluetongue virus genome. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 39(4): 185-92, 1972.
- 172 VERWOERD, D. W., ELS, H. J.; VILLIERS, E. M. de; HUISMANS, H. Structure of the bluetongue capsid. *J. Virol.*, 10(4): 783-94, 1972.
- 173 WALDVOGEL, A. S.; STOTT, J. L.; SQUIRE, K. R. E.; OSBURN, B. I. Strain - dependent virulence characteristics of bluetongue virus serotype 11. *J. gen. Virol.*, 67: 765-9, 1986.
- 174 WALTON, T. E. The diagnosis and control of bluetongue. *Bull. Off. int. Epiz.*, 92(7-8): 515-23, 1980
- 175 WANG, C. S.; LUEDKE, D. C.; CHOW, T. L. Soluble antigen of blue-tongue virus. *Inf. Immun.*, 5(4): 467-73, 1972.
- 176 WANG, L.; KEMP, M. C.; ROY, P.; COLLISON, E. W. Tissue tropism and target cells of bluetongue virus in the chicken embryo. *J. Virol.*, 62(3): 887-93, 1988.
- 177 WECHSLER, S. J. & MCHOLLAND, L. E. Susceptibilities of 14 cell lines to bluetongue virus infection. *J. clin. Microb.*, 26(11): 2324-7, 1988