

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE VÍRUS RELACIONADOS COM DOENÇAS  
RESPIRATÓRIAS EM OVINOS SADIOS E NATURALMENTE  
ACOMETIDOS**

**JULIO SIMÕES MARCONDES**

**BOTUCATU – SP  
Dezembro/2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CAMPUS DE BOTUCATU**

**PESQUISA DE VÍRUS RELACIONADOS COM DOENÇAS  
RESPIRATÓRIAS EM OVINOS SADIOS E NATURALMENTE  
ACOMETIDOS**

**JULIO SIMÕES MARCONDES**

Tese apresentada junto ao Programa  
de Pós Graduação em Medicina  
Veterinária para obtenção do título de  
Doutor.

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

**Botucatu/São Paulo  
Dezembro/2010**

Julio Simões Marcondes

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Ass. Dr. Roberto Calderon Gonçalves  
Presidente e Orientador  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

Prof.<sup>a</sup> Ass. Dr.<sup>a</sup> Alice Maria Melville Paiva Della Libera  
Membro  
Departamento de Clínica Médica FMVZ – USP –  
São Paulo

---

Prof.<sup>a</sup> Adjunto Giovana Wingeter Di Santis  
Membro  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Universidade Estadual de Londrina – Londrina-  
PR

Botucatu, 13 de dezembro de 2010.

### ***Aos meus pais***

**Plínio e Edna.** Esta tese não é o bastante para agradecer toda a vida dedicada a mim e meus irmãos. Com seus exemplos de pessoas íntegras amorosas, solidárias e éticas transmitiram o respeito, o amor, a confiança, a perseverança e a fé como valores fundamentais que formaram os alicerces da minha vida.

### ***A minha Esposa***

**Marlene** por seu amor, seu entusiasmo contagiante pela vida e por todo suporte e compreensão que me dedicou durante a realização deste doutorado e em todos os dias em que convivemos juntos.  
Agradeço a ela o incentivo e a confiança contínuos.

### ***Ao meu Filho***

**Italo Luchini Marcondes**, motivo de entusiasmo e paixão pela vida.

### ***A minha Avó***

**Risoleta Evangelista do Carmo**, (*in memoriam*) pelo exemplo de pessoa batalhadora, amorosa, que com dignidade lutou bastante pela vida.

**DEDICO ESSE TRABALHO**

## ***Agradecimentos***

**À DEUS,**

pela vida, saúde, pelos amigos que colocou em meu caminho, oportunidades que me oferece todos os dias e pela família maravilhosa que tenho.

Aos meus irmãos **Aline Simões Marcondes** e **Felipe Simões Marcondes** pela maravilhosa convivência, vida de harmonia, amizade, carinho, compreensão, paz, amor e que sempre torceram por mim.

Ao **Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves** meu orientador, professor e amigo, que ajudou a trilhar meu caminho na carreira acadêmica.

À **Drª Marcela Marcondes Pintor Rodrigues**, minha grande amiga e peça fundamental na colaboração deste trabalho na realização da técnica de imunoistoquímica, na documentação fotográfica deste trabalho e principalmente pela grande amizade e carinho.

À Doutoranda **Andreza Amaral Silva**, pelo companheirismo, amizade e co-participação nas principais etapas deste trabalho o que fortaleceu ainda mais a veracidade dos dados.

Ao Doutorando **Danilo Otávio Laurentti Ferreira** pela grande amizade e grande colaboração nas coletas de material e apoio nas ações de campo.

À Mestranda **Mayra Teixeira Alas Martins** pela grandiosa ajuda na análise citológica e tabulação dos dados do isolamento e sorologia.

À **Profa. Drª. Renné Laufer Amorim**, do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp/Botucatu), por abrir as portas do seu laboratório para realização da técnica de imunoistoquímica.

À professora do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP **Prof. Ass. Dr<sup>a</sup>. Noeme Souza Rocha**, pelo apoio que me foi dado, cedendo o laboratório de Citopatologia para que as amostras fossem processadas.

À **Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Cecília Rui Luivizotto** da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP Campus Araçatuba, pela amizade desde os tempos de graduação, pelo apoio moral e incentivo para a conclusão deste trabalho, que com tão boa vontade colaborou na realização da histopatologia.

À minha madrinha **Adélia Morelli** que sempre me acompanhou, apoiou e torceu pelos meus passos na carreira acadêmica.

Aos amigos leais e inesquecíveis, **Alfredo Lima, Caio Burini, João Carlos Ferreira** e demais confrades, por todos os momentos que passamos e que ainda passaremos juntos.

Aos professores **Alexandre Secorum Borges, Simone Biagio Chiacchio e Rogério Martins Amorim** da Clínica de Grandes Animais, pela amizade e oportunidades oferecidas durante os anos de minha formação em clínica de grandes animais.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, ao Departamento de Clínica Veterinária, ao Serviço de Patologia Animal e Seção de Pós-graduação, pela oportunidade concedida.

À **Dra Edviges Maristela Pituco** do Instituto Biológico pela realização dos exames sorológicos, isolamento viral, e material fornecido para as etapas de padronização da técnica de imunoistoquímica.

À todos os pesquisadores e pesquisadoras do Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo que colaboraram na realização das análises das amostras e confecção dos controles positivos e negativos para a técnica de imunoistoquímica.

Ao Engenheiro Agrônomo **Paulo Makimoto** diretor do Escritório de Desenvolvimento Rural de Tupã, pela colaboração e compreensão nos momentos necessários.

Ao funcionário **José Roberto** da seção de Pós- Graduação pela atenção e dedicação durante todo o período de pós-graduação

A todos os meus colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração e amizade;

Agradeço a todos funcionários da FMVZ – Botucatu, pelos momentos de convivência, brincadeiras e momentos agradáveis em que nos encontramos, em especial ao **Sr. Irineu Figueira, Mauri Raul, Marquinho, Marcão** pela amizade e companheirismo durante a residência e pós-graduação.

Ao Dr. **Adriano Dias** pela atenção, e realização da análise estatística, que não mediu esforços para a colaboração nesta etapa.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido sob forma de auxílio pesquisa, importante para a execução do trabalho;

Ao Abatedouro Dallpig e funcionários pela acolhida e colaboração na realização deste trabalho;

A todos aqueles que mesmo a distância, direta ou indiretamente, torceram por esta grande vitória.

À todos que contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                                                                                                                                                          | ix  |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                                         | x   |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                                       | xii |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                                                  | 2   |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                                                                                                                                                       | 6   |
| Capítulo 01.                                                                                                                                                                                                        |     |
| DETECTION OF SERUM ANTIBODIES TO PARAINFLUENZA TYPE 3<br>VIRUS, RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS, BOVINE VIRAL DIARRHEA<br>VIRUS, AND HERPES VIRUS TYPE 1 IN SHEEP IN THE REGION OF<br>BOTUCATU, SÃO PAULO – BRAZIL..... | 17  |
| Abstract.....                                                                                                                                                                                                       | 18  |
| Introduction.....                                                                                                                                                                                                   | 19  |
| Material and methods.....                                                                                                                                                                                           | 20  |
| Results.....                                                                                                                                                                                                        | 23  |
| Discussion.....                                                                                                                                                                                                     | 24  |
| Conclusion.....                                                                                                                                                                                                     | 26  |
| Acknowledgments.....                                                                                                                                                                                                | 26  |
| References.....                                                                                                                                                                                                     | 27  |
| Comprovante de submissão do Anexo 2 à revista JVMAH.....                                                                                                                                                            | 33  |
| Instruções aos autores JVMAH.....                                                                                                                                                                                   | 34  |
| Capítulo 02                                                                                                                                                                                                         |     |
| AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA<br>DOS VÍRUS PARAINFLUENZA-3 E VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO EM<br>OVINOS.....                                                                                | 38  |
| Resumo.....                                                                                                                                                                                                         | 39  |
| Abstract.....                                                                                                                                                                                                       | 40  |
| Introdução.....                                                                                                                                                                                                     | 41  |
| Material e métodos.....                                                                                                                                                                                             | 43  |
| Resultados.....                                                                                                                                                                                                     | 45  |
| Discussão.....                                                                                                                                                                                                      | 46  |
| Considerações Finais.....                                                                                                                                                                                           | 49  |

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Referências Bibliográficas.....                                                                                | 55  |
| Lista de tabelas e figuras.....                                                                                | 58  |
| Instruções aos autores Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....                                            | 59  |
| Capítulo 03                                                                                                    |     |
| COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DOENÇAS VIRAIS<br>RESPIRATÓRIAS EM OVINOS NATURALMENTE INFECTADOS..... | 65  |
| Resumo.....                                                                                                    | 66  |
| Abstract.....                                                                                                  | 67  |
| Introdução.....                                                                                                | 68  |
| Material e métodos.....                                                                                        | 70  |
| Resultados.....                                                                                                | 78  |
| Discussão.....                                                                                                 | 84  |
| Considerações Finais.....                                                                                      | 86  |
| Referências Bibliográficas.....                                                                                | 88  |
| Lista de tabelas e figuras.....                                                                                | 96  |
| Instruções aos autores Archivos de Medicina Veterinaria.....                                                   | 97  |
| 3. DISCUSSÃO GERAL.....                                                                                        | 107 |
| 4. CONCLUSÕES.....                                                                                             | 114 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                             | 116 |
| 6. ANEXOS.....                                                                                                 | 128 |
| Anexo 01 – Tabelas e quadros.....                                                                              | 129 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------|
| ABC    | Complexo Avidina Biotina                        |
| AVO-6  | Adenovírus Ovino tipo 6                         |
| ATCC   | American Type Cell Collection                   |
| BALT   | Tecido Linfóide Associado ao Brônquio           |
| BCP    | Broncopneumonia                                 |
| BPI-3  | Parainfluenza tipo 3 Bovino                     |
| BRSV   | Vírus Sincicial Respiratório Bovino             |
| BVDV   | Vírus da Diarréia Viral Bovina                  |
| CEC    | Célula Epitelial Cilíndrica                     |
| ECP    | Efeito Citopático                               |
| ELISA  | Ensaio imunoenzimático                          |
| HE     | Hematoxilina e eosina                           |
| HRSV   | Vírus Sincicial Respiratório Humano             |
| HV-1   | Herpesvírus tipo 1                              |
| IBGE   | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IHQ    | Imunoistoquímica                                |
| MDBK   | Madin-Darby Bovine Kidney                       |
| MEM    | Meio Essencial Mínimo                           |
| ORSV   | Vírus Sincicial Respiratório Ovino              |
| PCR    | Reação em Cadeia pela Polimerase                |
| PI-3   | Parainfluenza tipo 3                            |
| PMN    | Polimorfonucleares                              |
| RSV    | Vírus Sincicial Respiratório                    |
| RT-PCR | Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real  |
| SFB    | Soro Fetal Bovino                               |
| TCID   | Dose infectante para cultura de tecido          |
| VN     | Virusneutralização                              |

MARCONDES J. S. **PESQUISA DE VÍRUS RELACIONADOS COM DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM OVINOS SADIOS E NATURALMENTE ACOMETIDOS.** Botucatu, 2010. 116p., Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

A expansão econômica da ovinocultura acarreta no aumento do número de animais mantidos em confinamento e seu maior trânsito entre as propriedades. Com isso há aumento dos índices de doenças respiratórias nessa espécie, que estão entre as enfermidades que ocasionam maiores perdas econômicas em rebanhos de vários países. Grande parte das doenças respiratórias de mortalidade elevada e sintomatologia clínica evidente está associada a infecções por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Entretanto, outras enfermidades também acometem os ovinos e são pouco definidas etiológica e morfológicamente, especialmente as de etiologia viral. Os vírus têm sido incriminados como agentes precursores e agravantes quando em associação com infecção bacteriana secundária. Os métodos mais utilizados para identificação viral são a sorologia, isolamento viral, teste de vírus neutralização e reação em cadeia pela polimerase. Contudo, essas técnicas apresentam limitações quanto ao tempo de execução e a necessidade de equipamentos dispendiosos. Com a necessidade da detecção rápida de antígenos virais, métodos como imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos vem sendo mais estudados no diagnóstico de agentes etiológicos. A imunoistoquímica é uma opção para a identificação de diversos agentes etiológicos e vem sendo amplamente estudada nos casos de enfermidades respiratórias, devido a facilidade na execução e não necessitar equipamentos dispendiosos nem técnicas trabalhosas para armazenamento de amostras. Neste contexto, o propósito deste estudo foi avaliar ovinos com comprometimento de vias aéreas anteriores e processos broncopulmonares, detectados no exame clínico e exame histopatológico, e correlacionar os achados com a sorologia, citologia de vias aéreas anteriores e posteriores, com a imunoistoquímica para os Vírus sincicial respiratório bovino e vírus Parainfluenza-3 bovino. Foi detectado pela

sorologia 27,5% para o BPI-3 e 40% para o BRSV de amostras positivas. Houve o predomínio de pneumonia do tipo intersticial (56,7%) e na imunistoquímica detectou-se a presença de antígenos do BPI-3 em 13,3% e do BRSV em 20,0% das amostras analisadas.

**Palavras chave:** ovinos, doenças respiratórias, imunistoquímica, BPI-3, BRSV.

MARCONDES J. S. **Search for virus-related respiratory diseases in sheep and healthy naturally affects.** Botucatu, 2010. 116p. Tese Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

The economic expansion of sheep breeding cause an increase in the number of animals kept in confinement and increased traffic between these properties, increasing the rates of respiratory diseases in this species, which are among the diseases that cause major economic losses in herds in several countries. Much of respiratory diseases and high mortality evident clinical symptoms are associated with infections by *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, however, other diseases also affect sheep and are poorly defined etiology and morphology, especially viral diseases. Viruses have long been incriminated as agents precursors and aggravating when combined with secondary bacterial infection. The methods used for viral identification are serology, virus isolation, virus neutralization test, polymerase chain reaction. However, these techniques have limitations as to time of execution and the need for expensive equipment. With the need for rapid detection of viral antigens, methods such as immunofluorescence and enzyme immunoassays has been most studied in the search for etiologic agents. Immunohistochemistry is an option for the identification of other agents and has been widely studied in cases of respiratory illnesses due to ease of execution and does not require expensive equipment or laborious techniques for sample storage. In this context, the purposes of this research was to evaluate sheep with involvement of upper airways and bronchopulmonary cases, detected on clinical examination and histopathology, and correlate the findings with serology, cytology airways before and after, and immunohistochemistry for Virus Respiratory Syncytial and Parainfluenza virus. Was detected by serology 27.5% for the BIS-3 and 40% for BRSV positive samples. There was a predominance of interstitial pneumonia type (56.7%) and immunohistochemistry detected the presence of BPI-3 antigens in 13.3% and 20.0% of BRSV in the samples.

**Key words:** ovine, respiratory disease, Immunohistochemistry, Bovine Syncytial Respiratory Virus, Bovine Parainfluenza virus type 3.

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias em pequenos ruminantes estão entre as enfermidades que ocasionam maiores perdas econômicas nos rebanhos em vários países. Grande parte das pneumonias acompanhadas de mortalidade elevada e sintomatologia evidente está associada a infecções por *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, no entanto, outros tipos de pneumonias também acometem os ovinos e são pouco definidas etiologicamente e morfologicamente.

As viroses respiratórias de importância econômica incluem o vírus parainfluenza 3 (PI-3), vírus sincicial respiratório (RSV), adenovírus 6 e em menor escala de importância o adenovírus bovino tipo 2, adenovírus ovino tipo 1 e 5 e reovírus tipo 1, como causadores de infecções respiratórias e pneumonia. As infecções respiratórias virais aumentam a susceptibilidade dos animais às infecções bacterianas secundárias, facilitando a colonização de bactérias como a *M. haemolytica*, pela redução da eficiência do mecanismo de limpeza mucociliar, diminuição da fagocitose ou do potencial bactericida dos macrófagos alveolares e da atividade ciliar e, supressão da resposta imune (SHARMA & WOLDEHIWET, 1990; YENER et al., 2005).

Os métodos mais utilizados para diagnóstico do agente etiológico, principalmente nas viroses respiratórias, em ovinos são: sorologia (LEHMKUHL et al., 1985; DAL PIZZOL, et al., 1989), isolamento viral e teste de vírusneutralização (EVERMANN et al., 1985; LEHMKUHL et al., 1985), e recentemente, a reação de polimerização em cadeia (PCR) que apresentam suas limitações quanto ao tempo de execução e a necessidade de equipamentos dispendiosos. Com a necessidade da detecção rápida de antígenos virais, métodos como imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos estão sendo utilizados para diagnóstico de RSV em crianças hospitalizadas (SWENSON & KAPLAN, 1985). Também a técnica de imunoistoquímica vem sendo utilizada para identificação de diversos agentes etiológicos *in situ*, como na detecção de antígenos do BRSV em amostras de pulmões pneumônicos de bovinos (BRYSON et al., 1988a; FLORES et al., 2000), para localização tecidual de antígenos do Adenovírus Ovino (DEBEY et al., 2001) e verificação da prevalência do BPI-3 em amostras de pulmão de cabras (YENER et al., 2005). Esta técnica apresenta como vantagens a alta especificidade e a facilidade na execução da técnica que pode ser realizada em laboratório sem equipamentos de alto custo e sua avaliação é feita em microscópio óptico o que facilita a execução.

A região de Botucatu encontra-se como grande pólo da cadeia produtiva da ovinocultura paulista com número expressivo de animais. Segundo o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística existia 13.777 ovinos na região em 2008, representando cerca de 3% do número total de ovinos presentes no estado de São Paulo (453.261 cabeças). À medida que se intensificam as formas de criação de animais para produção, principalmente na espécie ovina, há aumento da suscetibilidade destes animais às infecções pertinentes a espécie. As enfermidades respiratórias são importantes na espécie ovina, uma vez que, há alta prevalência de animais sorologicamente positivos para os vírus respiratórios de interesse, associado ao histórico de alta porcentagem de animais portadores da *Mannheimia haemolytica* (VIANA, 2003).

Constatada a alta ocorrência de problemas respiratórios na espécie ovina, o estudo de técnicas laboratoriais complementares ao diagnóstico clínico, como o PCR e a imunoistoquímica, sobressaem de maneira importante para a exata detecção dos agentes envolvidos nos processos respiratórios, para que as

medidas profiláticas sejam mais efetivas e possam minimizar os prejuízos na ovinocultura.

Considerando-se a importância dos prejuízos causados pelas doenças respiratórias e a ausência de informações sobre a detecção de agentes etiológicos virais por imunistoquímica nas vias aéreas de ovinos no Brasil, o presente estudo propôs-se avaliar ovinos com comprometimento de vias aéreas, detectado no exame clínico, por meio de diferentes técnicas de diagnóstico para viroses respiratórias.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo geral a pesquisa dos vírus BPI-3 e BRSV em animais sadios e doentes. Os objetivos específicos foram:

- Identificar a presença dos vírus BPI-3 e BRSV circulantes em ovinos pela sorologia comparando-a com o isolamento viral;
- Caracterizar as células colhidas por escovação das vias aéreas anteriores e posteriores de animais sadios e com doença das vias aéreas;
- Identificar os vírus Sincicial Respiratório Bovino e Parainfluenza tipo 3 bovino por imunistoquímica em amostras histológicas de pulmão;
- Relacionar os achados histopatológicos com a imunistoquímica para os vírus estudados;

# ***REVISÃO DA LITERATURA***

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

As doenças respiratórias são um dos mais graves problemas de sanidade enfrentados na ovinocultura, tendo como etiologia bactérias, vírus, metazoários e neoplasias (AL-SULTAN et al., 1988; KIMBERLING, 1988; DUNBAR et al., 1990).

As enfermidades respiratórias causadas pela *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* e *Pasteurella multocida* são consideradas as mais importantes doenças respiratórias de origem bacteriana dos ruminantes domésticos, comuns em todas as partes do mundo. Os surtos freqüentemente levam a grandes perdas econômicas, decorrentes de alta mortalidade, taxa de crescimento reduzida, condenação das carcaças nos abatedouros, além dos custos com medicação e mão-de-obra associadas ao tratamento (GILMOUR et al., 1991a; VIANA, 2003). As enfermidades respiratórias estão ocupando lugar de destaque entre as doenças consideradas emergentes e com grande importância na exploração da pecuária mundial (FIGUEIREDO, 1997). Para uma avaliação paramétrica, a pasteurelose causada por *M. haemolytica* é responsável por 30% das mortes de bovinos no mundo, com perdas econômicas acima de um bilhão de dólares, somente na América do Norte

(GRIFFIN, 1997). Por outro lado, não estão disponíveis as estimativas mundiais sobre as perdas econômicas em ovinos (BROGDEN et al., 1998a), uma vez que muitos surtos não são relatados (MARTIN & AITKEN, 1991), especialmente no Brasil.

Belknap (2005) descreve como principais afecções de vias aéreas anteriores o tumor nasal enzoótico, infestações por *Oestrus ovis*, sinusites de diversas etiologias, faringites ocasionadas por traumatismos com infecção bacteriana secundária, abscessos retrofaríngeos e laringite necrótica por *Fusobacterium necrophorum*. Relacionada às vias aéreas posteriores estão as pneumonias típicas, as atípicas por helmintos e por aspiração; as viroses respiratórias como Parainfluenza tipo 3, Adenovírus e Vírus Sincicial Respiratório Ovino, as pneumonias causadas por Micoplasmas, a adenomatose pulmonar ovina ou carcinoma pulmonar ovino e a pneumonia progressiva ovina ocasionada pelo Maedi-Visna Vírus (MARTIN, 1996; ARAÚJO et al., 2004).

O Parainfluenza-3 (PI-3) e adenovírus, são considerados os maiores causadores de doenças respiratórias virais em ovinos, sendo mais freqüentemente isolado o PI-3 (MARTIN, 1996) que é considerado o agente mais importante para predisposição de pneumonia por *Pasteurella* sp (PUGH, 2005).

Os fatores debilitantes que interferem com o mecanismo normal de limpeza respiratória têm recebido atenção considerável em animais de laboratório e no homem (RADOSTITS et al., 2002). Alguns estudos em grandes animais mostram que microrganismos como o vírus Parainfluenza-3 (BRYSON et al., 1983; SLAUSON et al., 1987; BROWN & ANANABA, 1988), o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (FORMAN et al., 1982; BROWN & ANANABA, 1988), o vírus sincicial respiratório bovino e ovino (AL-DARRAJI et al., 1982; CASTLEMAN et al., 1985), o vírus da influenza e da rinopneumonite eqüina (WILLOUGHBY et al., 1992) e a *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (RICHARDS & RENSHAW, 1989; SLOCOMBE et al., 1990) podem reduzir os mecanismos de proteção pulmonar. São descritas alterações como destruição dos cílios das células epiteliais cilíndricas ciliadas, com redução do mecanismo de limpeza mucociliar (BRYSON et al., 1983; CASTLEMAN et al., 1985; WILLOUGHBY et al., 1992; SCOTT, 1994), e redução no número e na função

de macrófagos e neutrófilos (MARKHAN & WILKIE, 1980; WALKER et al., 1985; SLAUSON et al., 1987; BROWN & ANANABA, 1988; RICHARDS & RENSHAW, 1989; SLOCOMBE et al., 1990).

Nos últimos anos, os estudos das doenças do trato respiratório de pequenos ruminantes progrediram consideravelmente. Sua etiologia está sendo estudada, apesar de que no mundo todo, as publicações sobre ovinos são escassas (BROGDEN et al., 1998a).

Para que se possa diagnosticar o processo respiratório com mais acurácia é necessária a obtenção do maior número de dados semiológicos, e a utilização de exames complementares que permitam, além do diagnóstico morfológico o diagnóstico etiológico com rapidez e eficiência.

## **2.1 - VÍRUS RESPIRATÓRIOS DE IMPORTÂNCIA NA OVINOCULTURA**

Em experimento por levantamento sorológico realizado por dois anos consecutivos, a prevalência dos tipos virais encontrados na população ovina foi de 95% de amostras positivas para Adenovirus-5, 84,5% para o PI-3, 84,5% para RSV, 41,7% para Adenovirus-6, 8,7% para Diarréia Viral Bovina (BVD), 5,4% para Herpes Vírus Bovino-1 e 3,3% para Pneumonia Progressiva Ovina (LEHMKUHL et al., 1985).

A família *Paramyxoviridae* é composta por vírus RNA envelopado, de fita simples negativa, pleomórfico e um nucleocapsídeo contendo seu genoma e outras proteínas. Geralmente são compostas por 6 a 7 genes que codificam cerca de 8 a 9 proteínas. Compõe esta família a subfamília *Pneumovirinae*, compreendida pelos Vírus Sincicial Respiratório humano (HVR), ovino (ORSV), bovino (BRV) e recentemente descobertos os Metapneumovirus aviário e humano, e o gênero *Paramyxovirus*, destacando o Parainfluenza vírus com seus subtipos variando do 1 ao 4 (VAINIONPÄÄ & HYYPIÄ, 1994; EASTON et al., 2004).

O Vírus Sincicial Respiratório Bovino, pertencente à Subfamília *Pneumovirinae*, também tem sido isolado de ovinos e caprinos sadios e com doença respiratória, caracterizada por rinite moderada, em ovelhas naturalmente acometidas. Em cordeiros experimentalmente infectados, os principais achados clínicos foram apatia e taquipnéia, com evidente hiperemia da mucosa nasal e corrimento nasal seroso (LEHMKUHL & CUTLIP, 1979),

histologicamente as lesões caracterizam-se por bronquiolite supurativa e necrose de células epiteliais. (OLIVIER et al., 2009).

O papel do BRSV nas infecções respiratórias de ovinos ainda não é bem conhecido, no entanto, admite-se que anticorpos para este agente estejam bem difundidos nesta espécie animal. Houve isolamento do BRSV em ovinos com doença moderada no trato respiratório superior, assim como, o seu envolvimento nos mecanismos de defesa do sistema respiratório tornando o hospedeiro susceptível às infecções bacterianas secundárias (LEHMKUHL & CUTLIP, 1979; SHARMA & WOLDEHIWET, 1990). Desta forma, foi verificada a ocorrência de infecção cruzada entre as linhagens de PI-3 ovino de ovinos para bovinos assim como a variante de bovinos infectando ovinos, ocasionando doenças pulmonares moderadas a graves, com interferência nos mecanismos de defesa predispondo a infecções bacterianas secundárias (STEVENSON & HORE, 1970). As principais bactérias isoladas, nestes casos, são as habitantes normais da microbiota respiratória como a *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*, isoladas em 33,9% e 3% na nasofaringe e 48,9% e 13,3% na orofaringe, respectivamente, de ovinos sadios (VIANA et al., 2007).

O BPI-3 tem sido demonstrado por diversos pesquisadores em vários países, inclusive no Brasil, onde Dall Pizzol et al., (1989) detectaram 34% de amostras de soro positivas em ovinos e Gonçalves et al., (2009) detectaram 82% de amostras de soro ovino positivas. Este agente, por si só causa pneumonia, mas comumente faz parte do complexo respiratório das pneumonias enzoóticas (DUNGWORTH, 1993), onde é responsável por marcante perda de cílios das células ciliadas e desarranjo das células basais dos brônquios e bronquíolos (BRYSON et al., 1983).

Nos animais, ocorrem sinais como tosse, taquipnéia, apatia, anorexia, e febre. Histologicamente, as alterações são compatíveis com pneumonia intersticial subaguda difusa e broncopneumonia secundária, caracterizada por espessamento do septo alveolar, hiperplasia epitelial severa, infiltrados alveolares de macrófagos e neutrófilos (LEHMKUHL & CUTLIP, 1982). À medida que os animais sobrevivem à fase aguda da infecção pelo BPI-3 desenvolvem proliferação de células bronquiolares e do epitélio alveolar e apresentam-se macrófagos multinucleados com ou sem inclusões citoplasmáticas (DUNGWORTH, 1993).

No Brasil, Dal Pizzol et al., (1989) detectaram 70% de amostras de soro bovino positivas para BPI-3 dentre 393 examinadas e 34% de positivas em 205 amostras de soro ovino testadas. Na região de Botucatu detectaram-se em 82% (159/194), anticorpos para BPI-3 e em 58,8% (114/194), anticorpos para BRSV em amostras de soro ovino (GONÇALVES et al., 2009). Apesar das evidências sorológicas do BPI-3 e BRSV em ovinos no nosso país, raramente tem sido reportado o isolamento do agente na espécie.

## **2.2 ESTUDO CITOLÓGICO DAS VIAS AÉREAS**

A traquéia e os brônquios são revestidos por células epiteliais pseudo-estratificadas, ciliadas, comumente observadas no fluido da traquéia, mas não em amostras de fluido broncoalveolar (FERNANDES et al., 2000; BURKHARD et al., 2003). São células alongadas, com núcleo arredondado proeminente e citoplasma basofílico, com cílios na superfície apical, já o bronquiolar é cuboide e desprovido de cílios (BURKHARD et al., 2003).

Há uma variação muito grande do número total de células do lavado traqueobrônquico ou broncoalveolar em eqüinos, de tal modo que este dado seria de pouco valor para interpretação do caso clínico quando avaliado isoladamente (Sweeney & Smith, 1993).

A análise citológica do líquido obtido pelo lavado traqueobrônquico é extremamente valiosa na diferenciação dos processos infecciosos, alérgicos, parasitários e neoplásicos. O diagnóstico citológico é realizado pela contagem global associado a avaliação dos tipos celulares (BEECH, 1981; WHITWELL & GREET, 1984; STÖBER, 1993).

Durante a análise citológica devem ser observadas, além das contagens totais e diferenciais, as alterações morfológicas celulares, a presença de vacuolizações citoplasmáticas, de bactérias, fungos e muco. O aumento significativo de um tipo celular ou a presença de determinadas alterações morfológicas pode ser indicativo do agente causador da doença respiratória (WHITWELL & GREET, 1984), e a contagem diferencial apresenta maior valor diagnóstico do que a contagem total de células (ZINKL, 2002).

Em ovinos, Burrels & Williams (1987), detectaram predomínio de macrófagos, seguido por linfócitos e eosinófilos em lavados broncoalveolares por endoscopia e em lavado total de pulmão de ovinos abatidos, sem

alterações significativas entre as técnicas na contagem diferencial. No entanto, notaram aumento significativo no número total de células nas amostras obtidas por lavado total. A contagem diferencial não foi realizada nas amostras obtidas por entubação endotraqueal.

Em relação à coloração para a confecção das lâminas, Fernandes et al. (2000) utilizaram a coloração preconizada por Rosenfeld (1947), que permitiu a caracterização e diferenciação dos diversos tipos celulares e estruturas presentes nos lavados. Gonçalves (1997) utilizou Shorr e Giemsa para identificar as células e avaliar suas características morfológicas e, colorações especiais como o Gram, para definir a etiologia bacteriana e Gomori-Grocott para a fúngica, em lavados traqueobrônquicos de bezerros. A coloração de Shorr acentua detalhes nucleares, sendo valiosa na detecção de alterações morfológicas (MEYER, 2003), e bastante utilizada nas preparações de material do trato respiratório inferior de eqüinos (ZINKL, 2002).

Não há relatos na literatura sobre a análise de escovado de vias aéreas anteriores e posteriores na espécie ovina. No entanto, como nas outras espécies, inclusive no auxílio diagnóstico de tumores em humanos (SOLOMON et al., 1974), esta técnica pode ser utilizada como adjuvante na conduta clínica e no exame histopatológico.

Destacada a importância da citologia através da sondagem nasotraqueal, por ser um método eficiente e aplicável na rotina para coleta de amostras de vias aéreas inferiores em bezerros (GONÇALVES et al., 2004) e, a possibilidade do direcionamento etiológico das enfermidades respiratórias através destes achados, o exame citológico das vias aéreas na espécie ovina se tornou agente importante como adjuvante no diagnóstico histopatológico.

### **2.3 HISTOPATOLOGIA PULMONAR**

As lesões pulmonares evidenciadas no exame histopatológico do tecido pulmonar em ovinos inoculados com BPI-3 consistem em bronquiolite com hiperplasia do epitélio bronquiolar e raras células gigantes. Inclusões citoplasmáticas são comuns, podendo variar na forma e tamanho. Comumente aparecem de forma isolada, porém às vezes podem aparecer aos pares na mesma célula, em células epiteliais alveolares, macrófagos assim como em células epiteliais bronquiais e bronquiolares. Os alvéolos afetados geralmente

apresentam-se colapsados, com infiltrados de macrófagos e linfócitos no septo alveolar, podendo formar pequenas áreas de sincício (STEVENSON & HORE, 1970).

Yener et al., (2005) relatam como principais lesões encontradas em pulmões de caprinos acometidos por broncopneumonia, a hiperplasia do epitélio bronquiolar e células epiteliais alveolares e a bronquiolite obstrutiva com exsudado neutrofílico, com raros linfócitos e macrófagos. Nos alvéolos próximos aos bronquíolos constataram atelectasia, com marcante hiperplasia de pneumócitos tipo II e aumento no número de macrófagos alveolares e formações de sincícios celulares.

Histologicamente, as lesões causadas pelos BRSV caracterizam-se pela presença de células sinciciais. Inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas podem ser vistas dependendo principalmente da fase da infecção (BRYSON et al. 1983). Embora em menor quantidade, a presença de células sinciciais pode também ocorrer na infecção pelo BPI-3 (DUNGWORTH 1993). Driemer et al., (1993) evidenciaram células sinciciais em grande quantidade localizadas principalmente nos bordos dos lóbulos pulmonares, presentes nos alvéolos, bronquíolos e por vezes em vasos linfáticos de bovinos. Não observaram inclusões intracitoplasmáticas e as células sinciciais apresentavam número variável de núcleos dispostos centralmente. A presença de enfisema alveolar crônico com bordos de septos alveolares rompidos em forma de clava, por vezes intercalada com áreas de atelectasia, hipertrofia da camada muscular peribronquiolar e focos de metaplasia escamosa do epitélio bronquial e bronquiolar estava bem evidente. As alterações inflamatórias eram de grau moderado e com infiltrado mononuclear, principalmente e, com áreas focais de infiltração por eosinófilos. Os folículos linfóides peribronquiais estavam aumentados de volume.

## **2.4 DIAGNÓSTICO NOS PROCESSOS VIRAIS**

Os métodos mais utilizados para o diagnóstico do agente etiológico, principalmente nas viroses respiratórias são as provas sorológicas, incluindo os

testes de soro neutralização, teste de fixação de complemento, teste de imunofluorescência indireta e o método imunoenzimático (ELISA). Estas técnicas são consideradas indiretas, devido à detecção da presença de anticorpos contra o agente nas amostras testadas (LEHMKUHL et al., 1985; DAL PIZZOL, et al., 1989, RHODES, et al., 1989).

O isolamento viral em cultivo celular é considerado um teste clássico de diagnóstico em virologia. No entanto, a técnica apresenta algumas restrições, uma vez que é demorada, dispendiosa e necessita da implantação de cultivos celulares especiais. Além disso, é incapaz de detectar vírus que não cause efeito citopático (KNOWLES, 1997).

Variações da técnica imunoenzimática do tipo ELISA têm sido desenvolvidas como alternativa para a detecção laboratorial do BRSV (LOKENS GARD et al., 1992; GRUBBS et al., 2001), em cultivos celulares. A confiabilidade e exatidão de cada uma destas técnicas dependem dos reagentes e da sensibilidade e especificidade do anticorpo anti-BVSR utilizados. Técnicas alternativas como imunofluorescência e imunoistoquímica também vêm sendo amplamente aplicadas com bom desempenho na detecção do BRSV, em amostras clínicas (KIMMAN et al., 1986; HAINES et al., 1989; JOHNSTON & SIEGEL, 1990; MASSON et al., 1993; SCHRIJVER et al., 1996a; BRODERSEN & KELLING, 1998; ALKAN et al., 2000; SCHREIBER et al., 2000; SORDEN et al., 2000, FLORES et al., 2000; PEIXOTO et al., 2000)

O isolamento viral e o teste de vírus neutralização são técnicas diretas, que detectam a presença do vírus em amostras, por meio do cultivo em linhagens celulares, pela visualização do efeito citopático característico e pela demonstração da partícula viral, nestes cultivos. Recentemente está se utilizando a reação de polimerização em cadeia (PCR) que, no caso dos vírus RNA, promove a produção do DNA complementar ao RNA viral e posterior amplificação deste DNA. A técnica do PCR apresenta limitações relacionadas ao tempo de execução, a necessidade de *primers* específicos, além da necessidade de equipamentos dispendiosos e laboratórios apropriados (EVERMANN et al., 1985; VAINIONPÄÄ & HYYPIÄ, 1994).

Com a necessidade da detecção rápida de antígenos virais, métodos como imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos estão sendo utilizados para diagnóstico de RSV em crianças hospitalizadas, nos casos de surtos de

doenças respiratórias em rebanhos e nos estudos de doenças virais (SWENSON & KAPLAN, 1985; BRYSON et al., 1988a).

Dentre as técnicas que utilizam as reações imunoenzimáticas destaca-se a imunoistoquímica (IHC), utilizada na identificação de diversos agentes etiológicos, como na detecção de antígenos do BRSV em amostras de pulmões pneumônicos de bovinos (BRYSON et al., 1988a; FLORES et al., 2000), para localização tecidual de antígenos do Adenovírus Ovino (DEBEY et al., 2001), verificação da prevalência do BPI-3 em amostras de pulmão de cabras (YENER, et al., 2005) e para detecção de antígenos da *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (YENER et al., 2009). A IHC está sendo cada vez mais utilizada, devido à alta especificidade do teste e facilidade na execução da técnica, que pode ser avaliada em microscópio óptico sem a necessidade de equipamentos de alto custo.

A técnica de imunoistoquímica tem sido utilizada para detecção de partículas virais em amostras de pulmão armazenadas em blocos de parafina e em amostras recém coletadas de animais inoculados com RSV (BRYSON et al., 1988a). A técnica de imunoperoxidase mostrou-se eficiente na detecção de partículas virais nas amostras em blocos de parafina, tendo vantagem sobre as técnicas em que há necessidade de se congelar as amostras como a imunofluorescência, por permitir sua aplicação em tecidos fixados em formol. Outros autores relatam que a técnica de imunoistoquímica tem maior sensibilidade em relação à técnica de imunofluorescência, por utilizar o sistema avidina-biotina (FLORES et al., 2000). Tais autores relatam que a marcação de células positivas para antígenos do RSV foi marcadamente restrita às células epiteliais, havendo poucos casos com marcação em células e *debris* celulares no exsudato dos dutos pulmonares.

Tendo em vista o envolvimento dos agentes virais em processos respiratórios tanto de vias aéreas anteriores quanto de vias posteriores, muitas vezes isoladamente acometidas, faz-se necessário a obtenção de amostras por meios simples e técnicas laboratoriais satisfatórias para o diagnóstico etiológico das doenças das vias aéreas. Nesse contexto, o propósito deste estudo foi avaliar ovinos com comprometimento de vias aéreas e processos broncopulmonares, detectados no exame clínico, por meio de diferentes técnicas de diagnóstico para as viroses respiratórias.

# ***CAPÍTULO 01***

**Detection of serum antibodies to parainfluenza type 3 virus,  
respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhea virus, and  
herpes virus type 1 in sheep in the region of Botucatu, São  
Paulo - Brazil**

**Roberto Calderon Gonçalves<sup>1</sup>, Andreza Amaral da Silva<sup>1\*</sup>, Danilo Otávio  
Laurenti Ferreira<sup>1</sup>, Júlio Simões Marcondes<sup>1</sup>, Edviges Maristela Pituco<sup>2</sup>  
and Adriano Dias<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia de Botucatu – FMVZ, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

<sup>2</sup>Laboratório de Viroses de Bovídeos, Instituto Biológico de São Paulo.

<sup>3</sup>Grupo de Apoio à Pesquisa, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB,  
Universidade Estadual Paulista – UNESP.

---

\*Corresponding author: E-mail: andrezamedvet@yahoo.com.br. Tel 55-14-3811-6280; fax 55-14-3811-6067.

## **Abstract**

**Viral respiratory infections are common in sheep, and losses related to the introduction and spread of viral agents in flocks is inevitable of the growth of sheep production in the state of Sao Paulo, little is known about the frequency and dissemination of these agents in this state. The objective of this study was to investigate the occurrence of antibodies to bovine virus parainfluenza type 3 virus (BPI3), respiratory syncytial virus (BRSV), bovine viral diarrhea virus (BVDV), and herpes virus type 1 (BoHV-1) in sheep flocks in Botucatu region, São Paulo, Brazil. Blood samples were collected from 194 clinically healthy dams one to three years of age and analyzed for neutralizing antibodies against the target viruses. Frequency of antibodies was 82% (159/194) for BPI3, 58.8% (114/194) for BRSV, 0.5% (1/194) for BVDV, and no detection of BoHV-1. Titer of reactor samples ranged from 2 to 2048 for BPI3, from 2 to 64 for BRSV, and was 10 for the single reactor for BVDV. Results indicate that BPI3, BRSV, and BVDV occur in sheep flocks of the region of Botucatu, São Paulo, and that BPI3 is probably the main agent involved in viral pneumonia cases in the region.**

**Key words:** sheep, viral respiratory infections, serum, antibody titration

## INTRODUCTION

Respiratory disease is a major health concern in sheep production, leading to high morbidity and mortality rates (Martin, 1996; Cutlip et al., 1998). Respiratory disease are responsible for 10-40% of adult sheep mortality and for 17% of perinatal deaths (Rook et al., 1990; Vieira et al., 1993).

Viral respiratory infections, chiefly parainfluenza 3 virus (BPI-3) (Lehmkuhl and Cutlip, 1982) and respiratory syncytial virus (BRSV), play an important role in sheep production (Alley 1975). Other viruses, such as ovine adenovirus type 6 (AVO-6), bovine viral diarrhea virus (BVDV) (Pommer and Schamber, 1991), herpes virus type 1 (BoHV-1), and ovine progressive pneumonia (MVV) caused by the lentivirus maedi-visna (Pugh, 2005) may occur less frequently.

During the past decade, sheep-rearing in the state of Sao Paulo has increased to become one of the main occupations on many farms. With the intensification of production systems, animals are kept in closer contact, and diseases, mainly viral respiratory infections, have become more frequent. It is important to know which agents may be found among these animals in order to determine adequate measures to prevent or to control and manage viral respiratory infections and to limit the losses they cause. Although Sao Paulo is an important Brazilian state in terms of sheep production, there are no reports on the occurrence of viral respiratory infections in this species. The objective of this study was to determine antibody levels to BPI3, BRSV, BVDV, and BoHV-1 in sheep in the region of Botucatu, São Paulo, Brazil.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study area**

The Botucatu region is located in south-central Sao Paulo, Brazil and comprises a 1,482 km<sup>2</sup> area at an average altitude of 873 m. Climate in the region is humid subtropical with characteristically dry winters and hot summers. Annual mean temperature is 18°C.

### **Study animals**

A total of 194 Santa Inês 1 to 3 years old dams from five farms were used in the study. Animals were, healthy at physical examination, and had no history of recent respiratory disease and were not vaccinated against any of the viruses studied. They were kept in semi-intensive systems and had only incidental contact with other animal species, mainly bovines. The farms held a mean of 40 animals/hectare.

### **Study design**

The study took place in 2008, between June and August, when a higher frequency of viral respiratory infections is expected (Radostits et al., 2007). Farms participating in the study were designated A, B, C, D, and E. Samples were collected randomly from at least 10% of the sheep in each flock. According to the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), there were 13,777 sheep in the region of Botucatu in 2008, amounting to 3% of the total number of sheep in the state of Sao Paulo (453,261 head).

### Selection criteria

The following criteria were used to select the farms for the study: have medical records in the Large Animal Practice of the *Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - FMVZ*, have a history of sheep with clinical signs of respiratory disease in the two years preceding the study; not have animals of any species immunized with live or dead vaccine against the respiratory viruses; have adequate conditions for the samples to be collected, and have permission of the owners for the activities of the study to be carried out. The number of animals that had these conditions was around 900. Based on these facts and assuming that the prevalence of at least one infection was between 75% and 85%, the minimum sample size was 194 animals in order to develop a cross-sectional study, with type I and type II errors of 5% and 20%, respectively.

### Sample collection

Blood samples were collected (8 mL per animal) by venipuncture of the jugular vein using sterile vacuum tubes containing a serum separator gel (BD, Vacutainer<sup>®</sup>, USA). Nutritional status and signs of any disease were assessed when blood was collected. Tubes were labeled and taken to the Laboratório de Vírus de Bovídeos at Instituto Biológico de São Paulo in isothermal containers held at 4°C, where they were centrifuged at 900 x *g* for five minutes for serum separation (5804R, Eppendorf<sup>®</sup>, Germany).

## Neutralization tests

Each serum sample was submitted for a virus neutralization test (VNT) against BoHV-1 and BVDV according to the guidelines of the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals of the World Organization for Animal Health (OIE, 2009) and the BPI3 according to recommendations of the Code of Federal Regulation (CFR, 2005). The quantification of antibodies was performed in 96 wells microtitre plates using eight serial dilutions starting from 1:2 to 1:256 in the test for BPI3 and BoHV-1 and starting from 1:10 until 1:1280 for BVDV. Then 100 TCID<sub>50/50mL</sub> were added of each virus strain (BPI3 – from the American Type Cell Collection; BoHV-1/Los Angeles and BVDV/NADL strains provided by the Institute of Virology in Hannover, Germany). The microtitre plates were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 1 hour with BPI-3 and BVDV and for 18 hours for BoHV-1. Then 50 µl of a bovine kidney epithelial (MDBK) cell suspension for BVDV and BPI3 and 100µl of cell suspension for BoHV-1 were added at a concentration of 3x10<sup>5</sup> cells/mL. The microplates were further incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours, after which readings were made. The VNT was validated by back titration and control of viral dose (which should give a value of 100 TCID<sub>50</sub> with a permissible range of 20–300 TCID<sub>50</sub>), control cells and using sera from sheep that were known to be positive and negative. The test serum results are expressed as the reciprocal of the dilution of serum that neutralized the virus in 50% of the wells. The titers were calculated according to the method of Reed and Muench. Animals were considered BVDV positive for those which had titers equal to or greater than 10. For BoHV-1 and BPI3 titers above 2 were considered positive.

## Statistical analysis

The results, expressed as the frequency of occurrence in carriers of antibodies to the viruses were analyzed by Chi-square and Fisher's exact test (Snedecor and Cochran, 1980), using the algorithms developed for PASW Statistics, v. 17.0.2 according to the expected distribution obtained (Statistical Software PASW - version 17.0.2, Chicago, Illinois, USA). Significance level was set at 5%.

## RESULTS

Frequency of reactor animals among the 194 serum samples were: BPI3 = 82% (159/194) ( $p < 0.001$ ), BRSV = 58.8% (114/194) ( $p < 0.001$ ), and BVDV = 0.5% (1/194). No sample was positive for BoHV-1 (Table 1). Titers ranged from 2 to 2048 for BPI3, 2 to 64 for BRSV, and the only sample reactor to BVDV showed a titer of 10 (Table 2).

Only one sample showed antibodies to BPI3, BRSV, and BVDV (0.5%); 107 showed antibodies to BRSV and BVDV (55.1%). Fifty-seven samples were positive for only one type of virus (29.4%): 6 for BPI3 (3.1%), and 51 for BRSV (26.3%) ( $p < 0.001$ ).

## **DISCUSSION**

The presence of BPI3, BRSV and BVDV in sheep herds of Botucatu São Paulo, Brazil was confirmed. Since there are no commercially available vaccines against these viruses in sheep, and that animals in the study were not immunized with vaccines specific for bovines, antibodies detected indicate that these animals were exposed to natural infection, providing evidence of virus activity in the area. It should also be emphasized that no live vaccines were used in the immunization of bovines that had possible contact with the sheep studied. The frequency of animals positive for BPI3 was greater than those reported by Dal Pizzol et al. (1989), Manchego et al. (1998), and Cabello et al. (2006) suggesting that, among the respiratory viruses studied, BPI3 was the most widely spread in the flocks analyzed.

In countries such as the USA, where sheep are raised in intensive systems, BPI3 frequency in flocks may be over 70% (Lehmkuhl et al., 1985; Manchego et al., 1998), similar to the result observed in this study. Although rearing methods and management conditions of Brazilian flocks are very different from those of countries in the northern hemisphere, the frequency of BPI3 was extremely high. It is possible that close contact among animals, even for short periods of time, in the semi-intensive system used in the farms studied contributed to the high infection rate observed. Climatic conditions in the region during the study period, with mean temperature of 19°C, relative humidity of 51.25%, and precipitation of 45 mm, may have contributed to maintaining BPI3 in the environment.

Many animals showed antibody titers to BPI3 higher than 128, which is considered to be high for unvaccinated flocks (Cabello et al., 2006), suggesting that animals may have been recently challenged by the virus.

Although the frequency of occurrence of BRSV was similar to previous reports (Lamontagne et al., 1985; Cabello et al., 2006; Yeşilbağ and Güngör, 2009), it was lower than that of BPI3. BRSV and BPI3 have a special tropism for the respiratory tract and are widely spread among sheep, primarily in young animals (Lehmkuhl et al., 1985; Van Der Poel et al., 1994). The lower frequency of BRSV in sheep when compared to BPI3 may be related to its longer incubation period and slower spread among susceptible animals (Collins et al., 1988).

The finding of only one animal reactor to BVDV is strong evidence that there is no sheep persistently infected in the herds reducing the spread of the virus (Heckert et al., 1994). The presence of one persistently infected animal would have lead to the identification of more infected animals due to the susceptibility of sheep to BVDV. Greater prevalence rates reported by other authors, such as 14% by Lees et al. (1991), are associated with flocks that have persistently infected animals. In addition, pestiviruses are easily inactivated and are not resistant in the environment. A short infectivity outside the host may have contributed to the low frequency observed (Duffel and Hakness, 1985). In spite of the infrequent occurrence of BVDV, the presence of the agent in the region should not be ruled out, especially in outbreaks of respiratory disease. More intense research efforts may clarify the role of BVDV in the etiology of respiratory diseases of sheep.

No animal sampled showed antibodies to BoHV. This finding corroborates data in the literature reporting generally low or absent antibody titers against this virus in sheep (Howe and Woods, 1966; Parks and England, 1974; Brako et al., 1984; Rosadio et al., 1984; Lehmkuhl et al., 1985).

Although it was not possible to determine the origin of the viral infections, it is likely that incidental contact between sheep and bovines may have led to infection and maintenance of the agents in these flocks. Most sheep that make up the flocks in the south-central region of São Paulo come from southern Brazil, chiefly from the state of Rio Grande do Sul, where sheep and bovines are commonly reared together.

## **CONCLUSION**

BPI3, BRSV, and BVDV were found in sheep from flocks in the region of Botucatu, São Paulo, Brazil. Due to its high frequency of occurrence, BPI3 is probably the main agent implicated in viral pneumonia cases in the region. However, a wider and more intense research effort is necessary to better understand the role of each of these agents in the occurrence of sheep respiratory diseases in the region.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge the financial support of *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* – FAPESP (Process no. 2008/52138-8).

## REFERENCES

- Alley MR (1975). The bacterial flora of the respiratory tract of normal and pneumonic sheep. N. Z. Vet. J. 23: 113-118.
- Brako EE, Fulton RW, Nicholson SS, Aamborski GF (1984). Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea, parainfluenza-3, goat respiratory syncytial, bovine leukemia, and bluetongue viral antibodies in sheep. Am. J. Vet. Res. 45: 813-816.
- Cabello KR, Quispe RCH, Rivera HG (2006). Frecuencia de los virus parainfluenza-3, respiratório sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco. Rev. Investig. Vet. Peru 17: 167-172.
- Collins JK, Teegarden RM, Mac Vean DW (1988). Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle. Am. J. Vet. Res. 8: 1316-1319.
- Cutlip RC, Brogden AK, Lehmkuhl HD (1998). Changes in the lungs of lambs after intratracheal injection of lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* A1. J. Comp. Pathol. 118: 163-167.
- Dal Pizzol M, Ravazzolo AP, Fernandes JCT, Moojen V (1989). Detecção de anticorpos para o vírus Parainfluenza type 3 em bovinos e ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. Arq. Fac. Vet. UFRGS 17: 59-64.
- Duffel SJ, Harkness JW (1985). Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. Vet. Rec. 117: 240-245.

- Heckert RA, Dubuc C, Briscoe MR, Ranger M (1994). Prevalence of Border disease virus infection in a small group of Canadian sheep. *Can. Vet. J.* 35: 379-381.
- Howe DL, Woods GR, Marquis G (1966) Infection of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) with myxovirus parainfluenza type 3 and other respiratory viruses - results of serologic tests and culture of nasal swabs and lung tissue. *Bulletin of Wildlife Disease Association* 2: 34-37.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2008). Efetivo de rebanhos, January 2010.  
[www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P)
- Lamontagne L, Descoteaux JP, Roy R (1985). Epizootiological Survey of Parainfluenza-3, Reovirus-3, Respiratory Syncytial and Infectious Bovine Rhinotracheitis Viral Antibodies in Sheep and Goat Flocks in Quebec. *Can. J. Comp. Med.* 49: 424-428.
- Lees VW, Loewen KG, Deregt D, Knudsen R (1991). Isolation of border disease virus from twin lambs in Alberta. *Can. Vet. J.* 32: 678-682.
- Lehmkuhl HD, Cutlip RC (1982). Characterization of parainfluenza type 3 virus isolated from the lung of a lamb with pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 43: 626-628.
- Lehmkuhl HD, Randall C, Bolin SR, Brogden KA (1985). Seroepidemiologic survey for antibodies to selected viruses in the respiratory tract of lambs. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2601-2604.
- Manchego A, Rivera H, Rosadio R (1998). Seroprevalencia de agentes virales en rebaño mixto de una comunidad andina peruana. *Rev. Investig. Pec.* 9: 25-31.

- Martin WB (1996). Respiratory infections of sheep. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 171-179.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, January 2010.  
[www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00055.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00055.htm)
- Parks JB, England JJ (1974). A serological survey for selected viral infections of rocky mountain bighorn sheep. *J. Wildl. Dis.* 10: 107-110.
- Pinheiro RR, Chagas ACS, Andrioli A, Alves FSF (2003). *Viroses de pequenos ruminantes* (Embrapa Caprinos, Sobral).
- Pommer J, Schamber G (1991). Isolation of adenovirus from lambs with upper respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 204-210.
- Pugh DG (2005). *Sheep and goat medicine* (1nd ed.). WB Saunders Co. Philadelphia, PA.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* (10th ed.). Saunders Elsevier, Saint Louis, USA, 2156p.
- Rook JS, Scholman G, Wing-Proctor S, Shea M (1990). Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 6: 531-562.
- Rosadio RH, Evermann JF, DeMartini JC (1984). A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Vet. Microbiol.* 10: 91-96.
- Snedecor GW, Cochran, WG (1980). *Statistical Methods*, Iowa State, Ames, Iowa, p. 210.

- Van Der Poel WHM, Brand A, Kramps JA, Oirschot JT (1994). Respiratory syncytial virus infections in human beings and cattle, an epidemiological review. J. Infect. Dis. 29: 215-228.
- Vieira FJB, Trigo TFJ, Meza LJ, Romero FA, Pérez GT, Güemes FS (1993). Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet. Méx. 27: 107-112.
- Yeşilbağ K, Güngör B (2009). Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in North-Western Turkey. Trop. Anim. Health Prod. 41: 421–425.

**Table 1.** Parainfluenza type 3 virus (BPI3), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), and bovine diarrheavirus (BVDV) in sheep from farms in the Botucatu region, São Paulo, Brazil.

| Farm | No. of samples<br>(n=194) | Parainfluenza-3<br>(BPI3) <sup>a</sup> |      |                       | Respiratory syncytial virus<br>(BRSV) <sup>b</sup> |      |                     | Bovine viral diarrheavirus (BVDV) <sup>c</sup> |     |        |
|------|---------------------------|----------------------------------------|------|-----------------------|----------------------------------------------------|------|---------------------|------------------------------------------------|-----|--------|
|      |                           | Positive samples                       | %    | Titers *<br>(min/max) | Positive samples                                   | %    | Titers<br>(min/max) | Positive samples                               | %   | Titers |
|      |                           |                                        |      |                       |                                                    |      |                     |                                                |     |        |
| A    | 55                        | 52                                     | 94.5 | 2 – 2048              | 49                                                 | 89   | 2 – 64              | -                                              | -   | -      |
| B    | 54                        | 47                                     | 87   | 2 – 2048              | 27                                                 | 51.8 | 2 – 16              | 1                                              | 0.5 | 10     |
| C    | 19                        | 19                                     | 100  | 32 – 2048             | 16                                                 | 84.2 | 2 – 8               | -                                              | -   | -      |
| D    | 15                        | 15                                     | 100  | 16 – 2048             | 8                                                  | 53.3 | 2 – 32              | -                                              | -   | -      |
| E    | 51                        | 26                                     | 51   | 4 – 2048              | 13                                                 | 26   | 2 – 32              | -                                              | -   | -      |

\* Titer expressed as inverse of the dilutions; min – minimum; max - maximum

<sup>a</sup> PI-3: non-reactor < 2 (Fischer’s exact test = 47.419, p < 0.001)

<sup>b</sup> BRSV: non-reactor < 2 (Fischer’s exact test = 53.464, p < 0.001)

<sup>c</sup> BVDV: non-reactor < 10 (not performed)

**Table 2.** Number of samples for various titers of antibodies to parainfluenza type 3 virus (BPI3) and respiratory syncytial virus (BRSV) in sheep from farms in the Botucatu region, São Paulo, Brazil.

|                                                                   |             | <i>Antibody titers</i> * |                |                  |              |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|----------------|------------------|--------------|
|                                                                   | <i>Farm</i> | <i>2 - 8</i>             | <i>16 - 64</i> | <i>128 - 512</i> | <i>≥1024</i> |
| <b>Parainfluenza<br/>Type 3<br/>(BPI3<sup>a</sup>)</b>            | A           | 4                        | 10             | 26               | 12           |
|                                                                   | B           | 6                        | 17             | 18               | 6            |
|                                                                   | C           | 0                        | 4              | 10               | 5            |
|                                                                   | D           | 0                        | 4              | 7                | 4            |
|                                                                   | E           | 1                        | 10             | 11               | 4            |
| <b>Respiratory<br/>Syncytial<br/>Virus<br/>(BRSV<sup>b</sup>)</b> | A           | 33                       | 16             | 0                | 0            |
|                                                                   | B           | 26                       | 2              | 0                | 0            |
|                                                                   | C           | 16                       | 0              | 0                | 0            |
|                                                                   | D           | 7                        | 1              | 0                | 0            |
|                                                                   | E           | 11                       | 2              | 0                | 0            |

\* Titer expressed as the inverse of the dilution

<sup>a</sup> BPI3: non-reactor < 2

<sup>b</sup> BRSV: non-reactor < 2

Comprovante de submissão do Anexo 2 à revista JVMAH.

**De:** Veterinary Medicine <[jvmah.article@gmail.com](mailto:jvmah.article@gmail.com)>

**Para:** [andrezamedvet@yahoo.com.br](mailto:andrezamedvet@yahoo.com.br)

**Enviadas:** Quinta-feira, 5 de Agosto de 2010 17:12:29

**Assunto:** Accepted for publication ( JVMAH-10-013 Andreza et al )

|                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Journal of Veterinary Medicine and Animal Health</b><br><a href="http://www.academicjournals.org/JVMAH">www.academicjournals.org/JVMAH</a> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

05 August, 2010.

**Dear Dr. Andreza Amaral da Silva,**

**RE : JVMAH-10-013**

I am pleased to inform you that Editor have recommended your manuscripts JVMAH-10-013 titled “**Detection of serum antibodies to parainfluenza type 3 virus, respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhea virus, and herpes virus type 1 in sheep in the region of Botucatu, São Paulo - Brazil**” have been accepted for publication in the Journal of Veterinary Medicine and Animal Health (JVMAH) ([www.academicjournals.org/jvmah](http://www.academicjournals.org/jvmah)). The paper is an excellent paper and we have made few minor corrections. It will be published in the next, issue of the journal.

Yours sincerely,

**Dr. William G. Dundon**

Editor

Journal of Veterinary Medicine and Animal Health

[E-mail:JVMAH@acadjourn.org](mailto:JVMAH@acadjourn.org)

<http://www.academicjournals.org/JVMAH>

**The Journal of Veterinary Medicine and Animal Health will only accept manuscripts submitted as e-mail attachments.**

### **Regular Articles**

All portions of the manuscript must be typed double-spaced and all pages numbered starting from the title page.

The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present address(es) of author(s) should appear as a footnote.

The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The abstract should be 100 to 200 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 key words that will provide indexing references should be listed.

A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelt out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solidus presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP and DNA) need not be defined.

The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and Methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important

modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the author(s)'s experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the results but should be put into the discussion section.

The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The Acknowledgments of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph forms or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

**References:** In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author's name should be

mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

**Examples:**

Abayomi (2000), Agindotan et al. (2003), (Kelebeni, 1983), (Usman and Smith, 1992), (Chege, 1998; Chukwura, 1987a,b; Tijani, 1993,1995), (Kumasi et al., 2001)

References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., A. Kingori, University of Nairobi, Kenya, personal communication). Journal names are abbreviated according to Chemical Abstracts. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

**Examples:**

Chikere CB, Omoni VT and Chikere BO (2008). Distribution of potential nosocomial pathogens in a hospital environment. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3535-3539.

Moran GJ, Amii RN, Abrahamian FM, Talan DA (2005). Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 928-930.

Pitout JDD, Church DL, Gregson DB, Chow BL, McCracken M, Mulvey M, Laupland KB (2007). Molecular epidemiology of CTXM-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1281-1286.

Pelczar JR, Harley JP, Klein DA (1993). *Microbiology: Concepts and Applications*. McGraw-Hill Inc., New York, pp. 591-603.

## ***CAPÍTULO 02***

Artigo Científico a ser enviado para publicação na *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*

**Avaliação histomorfológica e detecção imunoistoquímica dos vírus  
Parainfluenza-3 e Vírus Sincicial Respiratório em ovinos.**

Julio Simões Marcondes<sup>1</sup>; Marcela Marcondes Pinto Rodrigues<sup>1</sup>; Danilo  
Otávio Laurentti Ferreira<sup>1</sup>; Andreza Amaral Silva<sup>1</sup>; Maria Cecília Rui Luivizotto<sup>2</sup>;  
Renée Laufer Amorim<sup>1</sup>; Roberto Calderon Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia de Botucatu – FMVZ, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

<sup>2</sup>Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de  
Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP

Endereço: Distrito de Rubião Júnior, S/N, Botucatu-SP  
CEP: 18.618-970  
Fone: (14) 3811 6280  
Fax: (14) 3811 6067  
marcondesjs@yahoo.com

## **Resumo**

O crescente destaque da ovinocultura paulista em número de cabeças e na qualidade genética dos animais faz com que haja maior aglomeração de indivíduos em ambientes fechados, predispondo-os aos diferentes desafios causadores de enfermidades respiratórias, principalmente os agentes virais, como o Parainfluenza Tipo 3 e o Vírus Sincicial Respiratório, citados como os de maior importância veterinária. No entanto, os relatos destes agentes na espécie ovina são escassos no Brasil.

As viroses respiratórias são de grande importância para a espécie ovina, assim como para a espécie bovina, inclusive com relatos de casos, no Brasil, com sérios prejuízos, tanto à saúde animal quanto do ponto de vista econômico, como pelo grande número de animais acometidos e pela mortalidade que ocorre. Tais vírus estão incriminados como precursores de doenças respiratórias, uma vez que servem de porta de entrada aos agentes bacterianos por danos ocasionados nos mecanismos de defesa mucociliar.

Neste contexto, o propósito deste estudo foi avaliar ovinos de campo encaminhados ao abate, apresentando sintomatologia de comprometimento de vias aéreas detectados no exame clínico, e submeter amostras de fragmentos pulmonares ao exame histomorfológico e à detecção de antígenos virais de Parainfluenza tipo 3 bovino e Vírus Sincicial Respiratório Bovino pela técnica de imunoistoquímica. Foi detectado neste estudo, 83,4% de animais com pneumonia intersticial, 6,7% de broncopneumonia supurativa e 3,3% de broncopneumonia supurativa no exame histopatológico dos animais com comprometimento do trato respiratório. Na técnica de imunoistoquímica foi detectada a presença de antígenos virais dos BRSV e BPI-3 em 20% e em 13,3%, respectivamente, nos animais do grupo doente.

**Palavras chave:** Parainfluenza-3 bovino, Vírus Sincicial Respiratório bovino, Ovinos, Histopatologia, Imunoistoquímica, Pulmão

## **Abstract**

The growing prominence of the sheep industry in São Paulo in the number of head and quality of animal genetic causes agglomeration of individuals there is greater indoors, predisposing them to the different challenges that cause respiratory diseases, especially viral agents such as parainfluenza type 3 and respiratory syncytial virus cited as the most important veterinary medicine. However, reports of these agents in sheep are scarce in Brazil.

The respiratory viruses are of great importance to the ovine species, as well as for the bovine species, including case reports, in Brazil, with serious damage, both animal health and the economic point of view, the large number of affected animals and the mortality that occurs. Such viruses are incriminated as precursors of respiratory diseases, once serving as a gateway to the bacterial damage caused by the mucociliary defense mechanisms.

In this context, the purpose of this study was to evaluate sheep sent to slaughter field, presenting symptoms of compromised airway detected on clinical examination, and submit samples of lung fragments histomorphological examination and antigen detection of bovine parainfluenza type 3 virus and Bovine Respiratory Syncytial by immunohistochemistry. Was detected in this study, 83.4% of animals with interstitial pneumonia, suppurative bronchopneumonia 6.7% and 3.3% for purulent bronchopneumonia in histopathological examination of animals with compromised respiratory tract. In immunohistochemistry detected the presence of viral antigens of BRSV and BPI-3 in 20% and 13.3% respectively in group patient.

**Keywords:** Bovine Parainfluenza-3, Respiratory syncytial virus bovine, Ovine, Histopathology, Immunohistochemistry, Lung

## Introdução

As doenças respiratórias são um dos mais graves problemas de sanidade enfrentados na ovinocultura, tendo como etiologia bactérias, vírus, metazoários e neoplasias (AL-SULTAN et al., 1988; KIMBERLING, 1988; DUNBAR et al., 1990).

Entre as doenças respiratórias que acometem os ovinos, as pneumonias são as mais freqüentes e de maior importância, com quadros clínicos variando de crônicos até agudos e fatais (RADOSTITS et al., 2002). Geralmente as pneumonias agudas estão relacionadas a infecções virais causadas por Vírus Parainfluenza tipo 3 (PI-3), Vírus Sincicial Respiratório Ovino (ORSV) e Adenovírus e, por bactérias como as Pasteurelas e Micoplasmas e, as crônicas, pela adenomatose pulmonar ovina ou carcinoma pulmonar ovino e a pneumonia progressiva ovina ocasionada pelo Maedi-Visna Vírus (MARTIN, 1996; ARAÚJO et al., 2004; BELKNAP 2005), embora as formas de apresentação clínica agudas possam evoluir e cronificar, inclusive com a interação entre agentes virais e bacterianos.

As enfermidades respiratórias causadas pela *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* e *Pasteurella multocida* são consideradas as mais importantes doenças respiratórias de origem bacteriana dos ruminantes domésticos, comum a todas as partes do mundo. Os surtos freqüentemente levam a grandes perdas econômicas decorrentes de alta mortalidade, taxa de crescimento reduzida, condenação das carcaças nos abatedouros, além dos custos com medicação e mão-de-obra associadas ao tratamento (GILMOUR et al., 1991; VIANA, 2003).

As pneumonias dos animais domésticos podem ser classificadas em quatro tipos histológicos distintos: broncopneumonia, pneumonia intersticial, pneumonia embólica e pneumonia granulomatosa. Os critérios usados para classificação são baseados nas alterações morfológicas, incluindo distribuição, textura, cor e aspecto do pulmão afetado. Usando essa classificação, é possível prever com algum grau de segurança a possível etiologia (vírus, bactéria, fungos, parasitas), porta de entrada (aerógena *versus* hematógena) e, caso o animal sobreviva, possíveis seqüelas para cada um desses tipos. No entanto, sobreposições desses quatro tipos de pneumonia são possíveis, e

dois tipos morfológicos distintos podem estar presentes no mesmo pulmão (CARLTON & McGAVIN, 1998).

Os agentes virais como o PI-3 e adenovirus são considerados os maiores causadores de doenças respiratórias virais em ovinos, sendo mais freqüentemente isolado o PI-3 (MARTIN, 1996) que é considerado o agente mais importante para predisposição à pneumonia por *Pasteurella* sp (PUGH, 2005). Nos animais, ocorrem sinais como tosse, taquipnéia, apatia, anorexia, e febre. Histologicamente as alterações são compatíveis com pneumonia intersticial subaguda difusa e broncopneumonia secundária, caracterizada por espessamento do septo alveolar, hiperplasia epitelial severa, infiltrados alveolares de macrófagos e neutrófilos (LEHMKUHL & CUTLIP, 1982; YENER et al., 2001).

No Brasil, foram feitos relatos de isolamento do vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) em bovinos criados extensivamente no Rio Grande do Sul (DRIEMEIER et al., 1997). No estado de Alagoas, Peixoto et al., (2000) também isolaram o BRSV em bezerros com problemas respiratórios apresentando alta morbidade e letalidade. Gonçalves et al., (2009) detectaram 82% de amostras positivas para PI-3, 58,8% para BRSV em amostras de soro de ovinos na região de Botucatu-SP

Em ovinos infectados experimentalmente com o BRSV foi detectada doença pulmonar discreta, caracterizada por pneumonia intersticial, bronquite e bronquiolite, podendo ser encontrado áreas de consolidação pulmonar dispersas, envolvidas por áreas enfisematosas, atelectasia, petéquias e equimoses, (LEHMKUHL & CULTLIP, 1979; AL-DARRAJI et al., 1982). Histologicamente, as lesões compreendem pneumonia intersticial multifocal, com infiltrado de macrófagos e polimorfonucleares nos septos alveolares (AL-DARRAJI et al., 1982a). A presença de células sinciciais e inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas podem ser vistas dependendo, principalmente, da fase da infecção (BRYSON et al. 1988). Embora em menor quantidade, a presença de células sinciciais também pode ocorrer na infecção pelo PI-3 bovino (BPI-3) (BRYSON et al. 1983; DUNGWORTH 1993).

O objetivo do presente trabalho foi descrever as lesões histomorfológicas de ovinos, naturalmente acometidos por doença respiratória, e comparar com a imunohistoquímica para detecção dos vírus BPI-3 e BRSV em amostras pulmonares de ovinos de campo submetidos ao abate, com sinais de problemas respiratórios.

### **Material e métodos**

Foram utilizados 40 ovinos independentemente de raça, sexo e idade, pertencentes a propriedades rurais do município de Botucatu – SP, sendo 10 clinicamente sadios e 30 portadores de problemas respiratórios detectados no exame clínico e submetidos ao abate em frigorífico devidamente amparado pelas exigências legais do Serviço de Inspeção Federal.

Fragmentos de pulmão de 2x2 cm foram retirados por meio de cortes transversais nos lobos pulmonares com lesão e em seguida foram fixados em solução tamponada de formalina 10%. As amostras foram processadas e incluídas em parafina. Cortes histopatológicos de 3 µm foram confeccionados e corados por hematoxilina e eosina (HE). As lesões microscópicas foram classificadas em pneumonia intersticial, broncopneumonia fibrinosa, e broncopneumonia supurativa de acordo com Carlton & McGavin, (1998). Após classificação morfológica, macro e microscópica, todos os animais que apresentaram alterações histopatológicas condizentes com pneumonia e/ou broncopneumonia foram selecionados para a realização da técnica de imunohistoquímica.

A técnica de imunohistoquímica para os vírus avaliados foi padronizada (Tabela 03 – Anexos) e realizada com o complexo avidina biotina (ABC) (Vector®), segundo Haines & Chelak (1991). Para o BRSV foi utilizado o anti-soro policlonal anti-BRSV (VMRD, Inc., Pullman, WA, USA, 210-70 BRSV) e para detecção do BPI-3 foi utilizado o anti-soro policlonal anti-PI-3 (VMRD, Inc., Pullman, WA, USA, 210-70 PI-3).

Novos cortes a 3 µm de espessura foram confeccionados e distendidos em lâminas silanizadas. Após desparafinização e desidratação, procedeu-se a recuperação antigênica em solução tampão citrato 10 mM (pH6,0) em microondas (700watts) em três ciclos de três minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluída a 3% em metanol com duas trocas de 10 minutos cada. Em seguida o material foi mantido durante uma hora, a 27°C, em solução de leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>) a 3% em água deionizada.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida, durante 18 horas (*overnight*) a 4°C. Para o anti-BRSV utilizou-se a diluição 1:50.000 e para o anti-PI3 a diluição de 1:3.200.

Utilizou-se o complexo Avidina Biotina (ABC) como anticorpo secundário para evidenciar os antígenos dos vírus estudados. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS pH 7,4 entre as etapas. Para a revelação da reação foi empregada a solução pronta para o uso de DAB (*Dako K3468*), por três minutos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas.

A avaliação imunoistoquímica foi realizada em microscópio óptico em aumento de 400X, localizando-se as lesões perivasculares, peribronquiais e peribronquiolares, com enfoque nas células epiteliais, nas lesões intersticiais e exsudato bronquial, sendo conferido resultado positivo ou negativo para a reação imunoistoquímica. As células foram consideradas positivas para a marcação dos vírus estudados quando se observou marcação citoplasmática de coloração acastanhada.

Os controles positivos e negativos utilizados na prova de imunoistoquímica foram preparados no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

Para preparação do controle positivo inoculou-se os vírus BRSV e BPI-3 em células da linhagem MDBK. Para a replicação viral, frascos de cultivo de 150cm<sup>3</sup> com monocamada pré-formada da linhagem de células MDBK foram infectados com 0,5mL de BRSV com título 10<sup>5,0</sup>TCID<sub>50</sub>/50μL e 0,5mL de BPI-3 com título 10<sup>5,5</sup>TCID<sub>50</sub>/50μL, após uma hora de incubação à estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation; Merlette, EUA) adicionou-se 60 mL de meio MEM com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, os frascos foram novamente incubados em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 30 horas para o BPI-3 e 146 horas para o BRSV, ocasião em que 60-70% da monocamada celular foi destruída pelo vírus. Nesse momento, a suspensão viral foi recolhida e centrifugada a 900 X G por 15 minutos a 4°C. O pellet foi

então fixado em formol 10% e utilizado como controle positivo. Ao contrário, para controle negativo da prova, foram utilizadas células não infectadas (Figuras 07 a 10).

Para inclusão e preparação das lâminas dos controles positivo e negativo, foi feita a cito inclusão das células fixadas em formol, e processadas sob a mesma metodologia dos fragmentos pulmonares para a histopatologia.

## **Resultados**

As lesões macroscópicas foram discretas e consistiram de petéquias, áreas de consolidação discretas, menores que 0,5cm, puntiformes em dois animais, e apenas um animal apresentou pequenos abscessos (<0,5cm). Os demais animais não apresentaram lesões macroscópicas significativas, a não ser algumas petéquias associadas à forma de abate.

Através da avaliação histológica das amostras pulmonares os animais foram classificados em saudáveis (10/40), sem lesões pulmonares microscópicas compatíveis com processos inflamatórios e doentes (30/40) com diferentes graus de evolução e tipos de lesões broncopulmonares. De acordo com as lesões, constatou-se pneumonia intersticial discreta em 17/30 (56,7%) dos pulmões avaliados pneumonia intersticial moderada em 5/30 (16,7%) e pneumonia intersticial grave em 3/10 (10,0%). A pneumonia abscedativa crônica foi constatada em 2/30 (6,7%) e broncopneumonia supurativa (BCP) em 1/30 (3,3%), (Figuras 01 a 04). As lesões que tornaram possível o diagnóstico da doença pulmonar nos animais avaliados estão apresentadas no Quadro 01.

A pneumonia intersticial caracterizou-se pelos achados histopatológicos como hiperplasia do tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) com infiltrado perivascular e predomínio de células mononucleares, espessamento do septo alveolar com polimorfonucleares (PMN) e áreas de atelectasia (Figura 01). Nos animais com pneumonia intersticial moderada notou-se, além das lesões citadas, o predomínio de infiltrado perivascular com prevalência de PMN e presença de áreas de atelectasia, fibrose discreta e congestão vascular, com marginação de leucócitos. A BCP caracterizou-se pela presença de exsudato supurativo em brônquios menores, com fibrina e PMN, e hiperplasia de células epiteliais bronquiolares com duas camadas (Figura 03).

Dos 40 animais avaliados, 30/40 (75%) apresentaram lesão pulmonar e deste grupo de animais com envolvimento broncopulmonar 10/30 (33,3%) apresentaram reação positiva à imunoistoquímica para os vírus estudados (Quadro 01), sendo que destes 13,3% (4/30) foram positivos para o BPI-3 (Figura 05) e 20% (6/10) foram positivos para o BRSV (Figura 06).

### **Discussão**

Os animais utilizados neste estudo apresentaram sinais clínicos de envolvimento respiratório como corrimento nasal, espirros, tosse e dispnéia caracterizando animais com alterações em vias anteriores e/ou posteriores, conforme descrito por Marcondes (2007). As lesões macroscópicas foram discretas, sendo que apenas um dos dois animais que apresentaram pneumonia abscedativa apresentou dois pequenos abscessos na superfície pulmonar do lobo acessório direito. Nos demais animais predominou a presença de petéquias subpleurais provavelmente associadas à forma de abate com insensibilização por choque e sangria.

As lesões histopatológicas encontradas, condizentes com a classificação de pneumonia intersticial (CARLTON & McGAVIN, 1998), se mostravam com diferentes graus de evolução devido à utilização de animais de campo no momento do abate, sem o conhecimento do tempo exato de incubação, evolução da doença e a possibilidade de associação de outros agentes envolvidos.

A infecção experimental pelo BRSV caracteriza-se por focos de pneumonia intersticial, hemorragia, bronquite e bronquiolite com acúmulo de células mononucleares, predominantemente macrófagos, nos septos alveolares e espaço aéreo, sem a evidência de *debris* celulares e poucos neutrófilos nos bronquíolos (AL DARRAJI et al., 1982). Em casos de infecção natural pelo BRSV, além das lesões descritas foi notada a formação de células sinciciais (PEIXOTO et al., 2003). Tais células não foram notadas nos animais deste estudo, provavelmente devido ao tempo de evolução da doença. Já nos animais infectados experimentalmente com o BPI-3 as lesões microscópicas são caracterizadas por bronquite necrótica e bronquiolite com presença de exsudato neutrofílico e espessamento dos septos alveolares, proliferação de células bronquiolares e do epitélio alveolar, e a presença de raras células

multinucleadas com inclusões eosinofílicas (DUNGWORTH, 1993). Tais lesões são condizentes com nossos achados, principalmente nos dez animais (10/30) que apresentaram marcação positiva aos antígenos do BRSV e PI-3.

Neste estudo diagnosticaram-se animais com pneumonia intersticial discreta, (17/30) que apresentavam infiltrados de células mononucleares, infiltrados perivascular com mono e polimorfonucleares, espessamento do septo alveolar e hiperplasia do BALT, condizentes com a literatura (AL DARRAJI et al., 1982, AL DARRAJI et al., 1982a). Destes animais, seis apresentaram-se positivos na imunoistoquímica sendo dois para BPI-3 e quatro para o BRSV representando 11,8% e 23,5%, respectivamente. Nos cinco casos de pneumonia intersticial moderada foi detectado um caso positivo para BPI-3 e um para o BRSV (Tabela 01).

As lesões histopatológicas tendem a se agravar quando há associação dos agentes virais com agentes bacterianos, como descrito por Al-Darraj et al., (1982) com presença de áreas de pneumonia intersticial e consolidação pulmonar, com infiltrado de células intersticiais predominando macrófagos linfócitos e poucos PMN, assim como a presença de áreas de necrose alveolar focal, hiperplasia e hipertrofia de células alveolares e ocasionalmente detectaram células gigantes multinucleadas. Fazendo uma analogia com os achados descritos pelo autor acima, é possível afirmar que nos animais 14, 19 e 20, cujo diagnóstico histopatológico foi broncopneumonia supurativa e pneumonia abscedativa, houve uma interação entre agentes bacterianos, e apenas no animal 14 houve ainda a presença de antígeno viral detectado na imunoistoquímica.

Segundo Bryson et al., 1988 os antígenos virais são detectados mais facilmente entre 4 e 7 dias de evolução após inoculação com BRSV, notando no tecido peribronquiolar e perivascular a presença de hiperplasia linfóide de leve a acentuada; relatam ainda que a reação pela imunoperoxidase foi de forma granular dentro do citoplasma de células epiteliais. Estes dados são condizentes com os achados histopatológicos e da imunoistoquímica dos animais diagnosticados com o BRSV (Figura 06) e sugere que os 16 animais negativos na IHC, porém com lesões histopatológicas possam estar nesta fase da infecção viral.

A broncopneumonia supurativa, pneumonia fibrinosa e pneumonia abscedativa crônica diagnosticadas neste estudo estão condizentes com a literatura quanto à possibilidade de agentes bacterianos envolvidos (LENHKHUL & CULTLIP, 1979; AL-DARRAJI et al., 1982).

Corroborando com a literatura (AL-DARRAJI et al., 1982, DRIEMEIER et al., 1997, PEIXOTO et al., 2000), notou-se neste estudo uma prevalência dos casos de pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT, espessamento do septo alveolar, infiltrado intersticial de monócitos e polimorfonucleares, nos animais com envolvimento de vias aéreas (17/30), no entanto, não foram observadas células gigantes multinucleadas e lesões sinciciais. No animal 14 onde houve marcação positiva para o BRSV foi identificada a presença de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas.

Nos animais positivos para o BRSV (6/30) predominou o espessamento do septo alveolar com PMN, presença de áreas de atelectasia, com espessamento da pleura e fibrose, concordando com os achados em ovinos inoculados com BRSV que apresentaram pneumonia intersticial multifocal com infiltrado de macrófagos, PMN nos septos intra-alveolares, com áreas de atelectasia e enfisema (AL-DARRAJI et al., 1982). Da mesma forma, tais autores não notaram a presença de inclusões eosinofílicas, no entanto, detectaram raras células multinucleadas. Já em bezerros, as lesões são mais características com formação de sincícios e marcação imunoistoquímica em animais sacrificados entre cinco e sete dias pós inoculação (BRYSON et al., 1983).

É possível afirmar que os animais deste estudo tenham adquirido a infecção dos vírus estudados pelo contato com bovinos nas diferentes fases de criação nas propriedades, concordando com GONÇALVES et al., (2009) que detectaram amostras sorológicas positivas para os vírus BPI-3 e BRSV sugerindo que os animais foram expostos à infecção natural por esses agentes, uma vez que não foram imunizados com vacinas específicas para bovinos.

A imunoistoquímica é um método rápido, podendo ser utilizado na rotina em casos onde há suspeita de agentes virais e bacterianos envolvidos nos casos de pneumonia, especialmente nos casos onde os fragmentos pulmonares precisam ser fixados em formol antes de ser enviado ao laboratório. Por permitir a realização da técnica em fragmentos fixados em

formol, a imunoistoquímica também pode ser utilizada em estudos retrospectivos (BRYSON et al., 1988).

Utilizando o sistema ABC com anticorpos policlonais (VMRD- Pulmann) anti-BRSV e anti-BPI-3 foi possível a identificação de células positivas para os vírus estudados. Isso corrobora com os dados de Bryson et al., (1988) que detectaram células positivas no epitélio bronquial e bronquiolar e, menos freqüente no citoplasma de células alveolares e de Yener et al., (2005) que utilizando o mesmo anticorpo detectaram antígenos de BPI-3 em pulmões de cabras. Al-Darraji et al., (1982a) afirmam ainda que tais lesões são menos extensas e moderadas em cordeiros inoculados somente com o BRSV do que quando inoculados em associação com a *Pasteurella haemolytica* três e cinco dias após a inoculação do BRSV.

### **Considerações Finais**

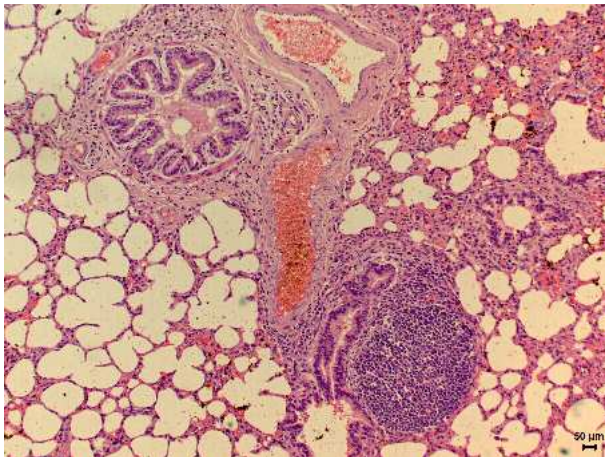
Os resultados do presente trabalho demonstram que a imunoistoquímica para o BRSV e BPI-3 apresentou resultados satisfatórios com o protocolo utilizado. Esta técnica é uma importante ferramenta de diagnóstico de rotina laboratorial, contribuindo nos processos cuja identificação do agente etiológico seja imprescindível para a tomada de decisão frente a surtos de problema respiratório, complementando os já tradicionais recursos diagnósticos de sorologia, isolamento, cultivo e identificação de agentes etiológicos, uma vez que o isolamento não foi confirmado. Os vírus estão presentes no rebanho ovino, ocasionando enfermidades respiratórias em diferentes graus de severidade, permanecendo de forma branda podendo ocasionar sérios prejuízos a ovinocultura, havendo a necessidade de mais estudos na espécie ovina.

**Tabela 01.** Diagnóstico histopatológico com a frequência de marcação por imunoistoquímica para os BPI-3 e BRSV.

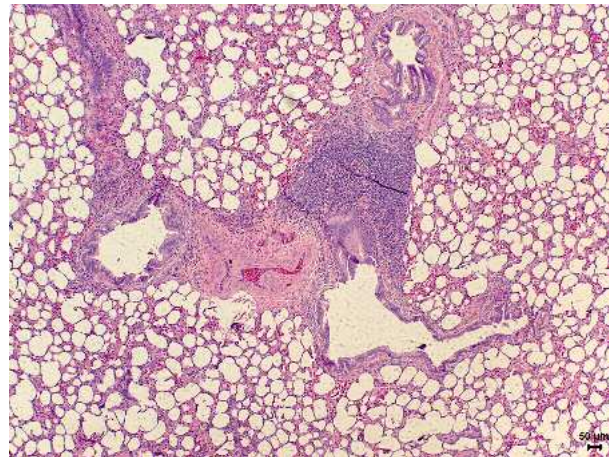
|                                 | Diagnóstico histopatológico |       | Imunoistoquímica |      |      |       |
|---------------------------------|-----------------------------|-------|------------------|------|------|-------|
|                                 |                             |       | BPI-3            |      | BRSV |       |
|                                 | n                           | %     | n                | %    | n    | %     |
| Pneumonia intersticial discreta | 17                          | 56,7  | 2                | 11,8 | 4    | 23,5  |
| Pneumonia intersticial moderada | 5                           | 16,7  | 1                | 20,0 | 1    | 20,0  |
| Pneumonia intersticial grave    | 3                           | 10,0  | 1                | 33,3 | 0    | 0,0   |
| Pneumonia fibrinosa             | 2                           | 6,7   | 0                | 0    | 0    | 0,0   |
| Broncopneumonia supurativa      | 1                           | 3,3   | 0                | 0    | 1    | 100,0 |
| Pneumonia abscedativa crônica   | 2                           | 6,7   | 0                | 0    | 0    | 0,0   |
|                                 | 30                          | 100,0 | 4,0              |      | 6,0  |       |

**Quadro 1.** Achados histopatológicos e diagnóstico histopatológico, de ovinos com envolvimento pulmonar e positivos à reação por imunistoquímica para o BPI-3 ou BRSV.

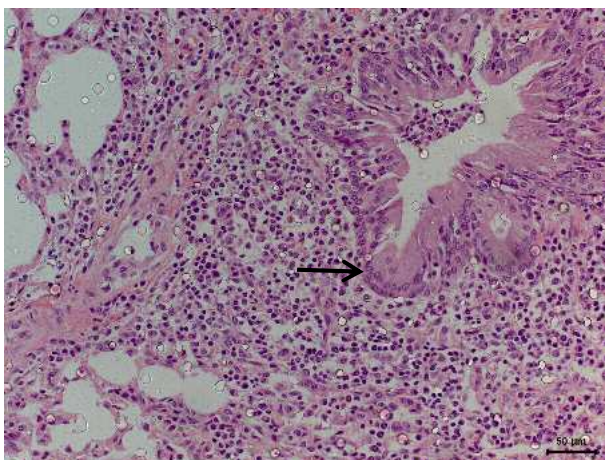
| Animal | Achados histopatológicos                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Diagnóstico histopatológico                       | Imunoistoquímica |      |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------|------|
|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                   | BPI-3            | BRSV |
| 2      | Infiltrado perivascular com células mononucleares, espessamento do septo alveolar com Polimorfonucleares (PMN) na luz, presença de neutrófilos em capilares, áreas de atelectasia, com fibrose, espessamento da pleura                                                                                                             | Pneumonia intersticial                            | -                | +    |
| 5      | Hiperplasia de BALT com infiltrado perivascular de células mononucleares com espessamento do septo alveolar, áreas de atelectasia e hemorragia                                                                                                                                                                                     | Pneumonia intersticial                            | -                | +    |
| 6      | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular de células mononucleares com espessamento do septo alveolar                                                                                                                                                                                                                           | Pneumonia intersticial                            | -                | +    |
| 12     | Hiperplasia de BALT, com espessamento do septo alveolar                                                                                                                                                                                                                                                                            | Pneumonia intersticial dsicreta                   | -                | +    |
| 14     | Infiltrado misto mono e PMN, presença de inclusões citoplasmáticas em células epiteliais bronquiolares, presença de exsudato supurativo com fibrina e PMN, hiperplasia do BALT com predomínio de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, exocitose de leucócitos, hiperplasia de células epiteliais e bronquiolares com duas camadas | Broncopneumonia supurativa ou purulenta acentuada | -                | +    |
| 26     | Infiltrado perivascular e intersticial com predomínio de PMN e presença de espessamento do septo alveolar e áreas de atelectasia                                                                                                                                                                                                   | Pneumonia intersticial moderada                   | -                | +    |
| 15     | Espessamento do septo alveolar, áreas de atelectasia e hiperplasia de BALT                                                                                                                                                                                                                                                         | Pneumonia intersticial                            | +                | -    |
| 21     | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular com predomínio de mononucleares e espessamento do septo alveolar                                                                                                                                                                                                                      | Pneumonia intersticial grave                      | +                | -    |
| 23     | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular focal com predomínio de mononucleares.                                                                                                                                                                                                                                                | Pneumonia intersticial                            | +                | -    |
| 36     | Infiltrado de PMN e mononucleares, espessamento do septo alveolar e e áreas de atelectasia                                                                                                                                                                                                                                         | Pneumonia intersticial moderada                   | +                | -    |



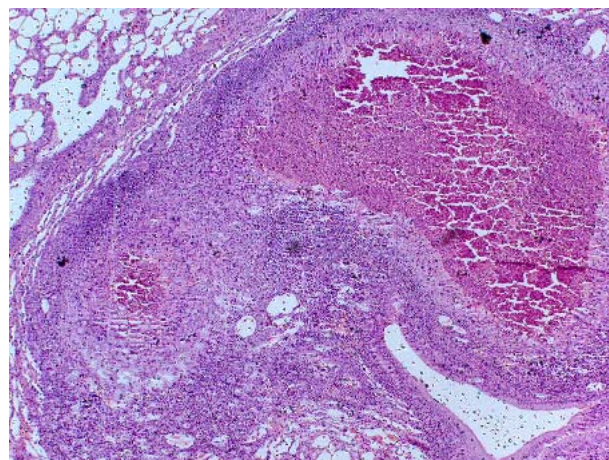
**Figura 01.** Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT e espessamento dos septos alveolares, HE 100x.



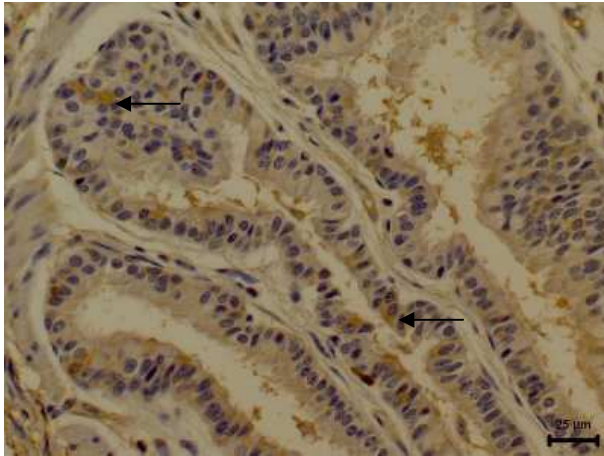
**Figura 02.** Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT, espessamento dos septos alveolares e congestão de vasos, HE 50x.



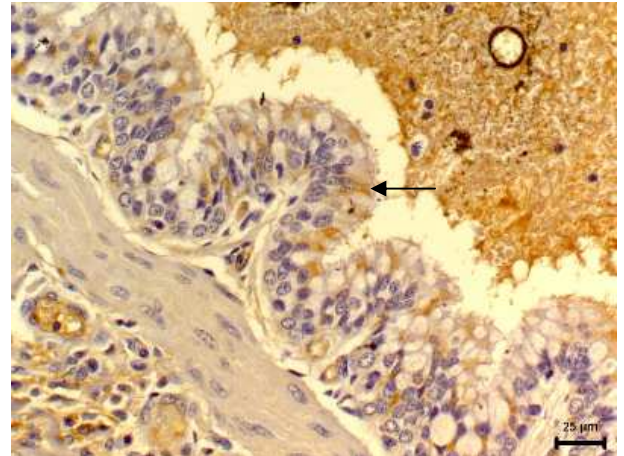
**Figura 03.** Broncopneumonia supurativa, com hiperplasia do BALT, com predomínio de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, e hiperplasia de células epiteliais bronquiolares (→), HE, 200x.



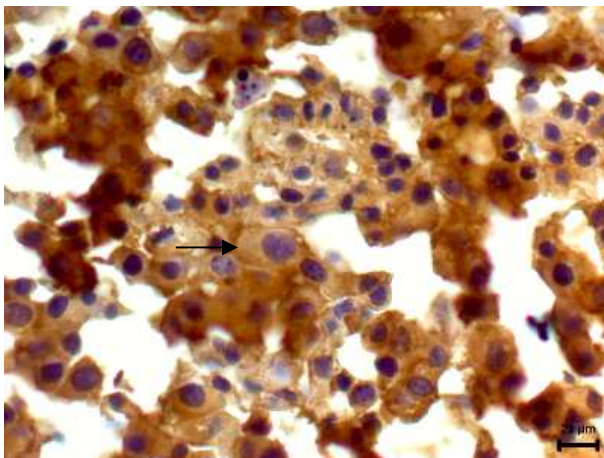
**Figura 04.** Pneumonia abscedativa com presença de abscessos subagudos difusos e focos de infiltrado mononuclear, HE, 50x.



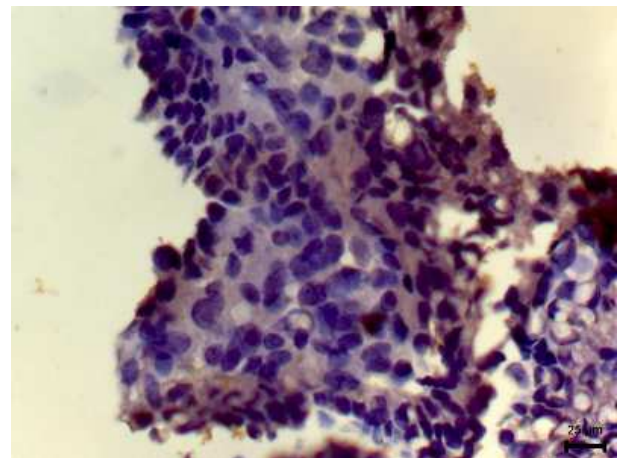
**Figura 05.** Imunomarcacão positiva para o anticorpo BPI-3. Presença de antígenos virais do BPI-3 em células epiteliais. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-PI-3, DAB, contra-coloração hematoxilina, 25μm, 400X.



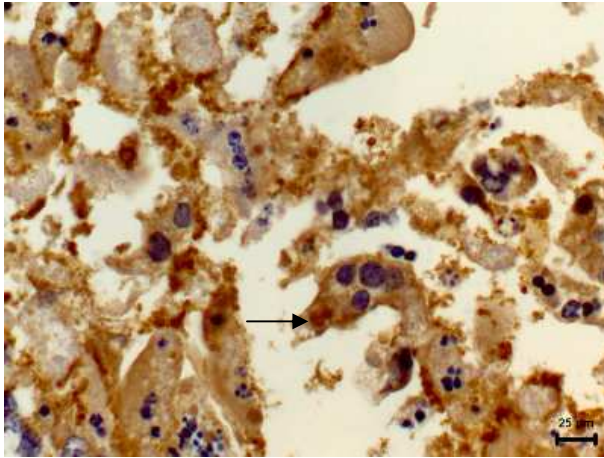
**Figura 06.** Imunomarcacão positiva para o anticorpo BRSV. Presença de antígenos virais do BRSV em células epiteliais de brônquios. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV, DAB, contra-coloração hematoxilina, 25μm, 540X.



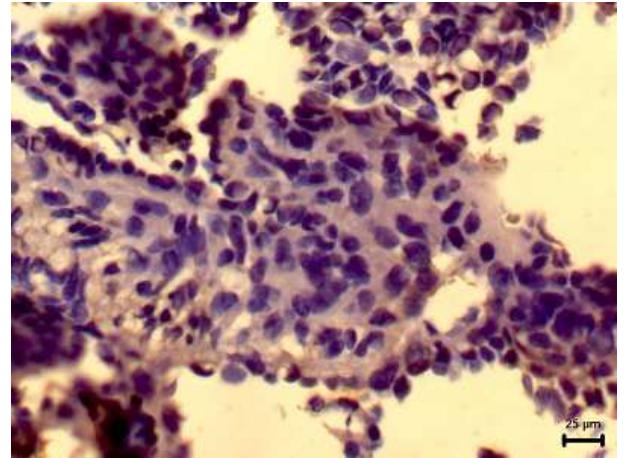
**Figura 07.** Imunomarcacão positiva para o anticorpo BPI-3. Controle positivo, presença de antígenos para o BPI-3, marcação positiva no citoplasma. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-PI-3, DAB, contra-coloração hematoxilina 25μm, 540x.



**Figura 08.** Controle negativo para o BPI-3, ausência de antígenos do BPI-3. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-PI-3, DAB, contra-coloração hematoxilina 25μm, 540x.



**Figura 09.** Controle positivo para o BRSV, presença de células com antígenos do BRSV e inclusões intracitoplasmáticas. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV, DAB, contra-coloração hematoxilina, 25µm,540x.



**Figura 10.** Controle negativo para o BRSV, ausência de antígenos do BRSV. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV, DAB, contra-coloração hematoxilina, 25µm,540x.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DARRAJI, A.M.; CULTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; GRAHAM, D.L. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial vírus and *Pasteurella haemolytica*: Pathologic studies. **Am. J. Vet. Res.** v.42, n.2, p.224-229, 1982a.

AL-DARRAJI, A.M.; CULTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial vírus and *Pasteurella haemolytica*: immunofluorescent and electron microscopic studies. **Am. J. Vet. Res.** v.42, n.2, p.230-235, 1982.

AL-SULTAN, I.I.; AL-SADI, H.I.; YOUKANNA, S.O.; Pneumonia in Sheep and Goats in Iraq: A Pathological study. **Indian J. of Anim. Sciences**, v.58, n.9, p.1007-1010, 1988.

ARAÚJO, S.A.C.; DANTAS, T.V.M.; SILVA J.B.A.; RIBEIRO, A.L.; RICARTE, A.R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Identificação do maedi-visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. **Arq. Inst. Biol.** v.71, n.4, p.431-436, 2004.

BELKNAP, E. B. Enfermidades do sistema respiratório. In: PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 119-43, 2005.

BRYSON, D.G., McNULTY, M.S., McCRACKEN, R.M., CUSH, P.F. Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. **J. Comp. Pathol.**, v.93, p.397-414, 1983.

BRYSON, D.G.; CUSH, P.F.; McNULTY, M.S.; PLATTEN, M.; ALLAN, G.M. An immunoperoxidase method of detecting respiratory syncytial virus antigen in paraffin of pneumonic bovine lung. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, n. 7, p.1121-26, 1988.

CARLTON, W.W.; McGAVIN, M. *Patologia veterinária especial*. 2.ed. Porto Alegre; ArtMed. 1998. 672p.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M.J.P.; MOOJEN, V.; ARNS, C.W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U.M. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v.17, n.2, p.77-81, 1997.

DUNBAR, M.R.; WARD, A.C.S.; POWER, G. Isolation of *Pasteurella haemolytica* from Tonsillar biopsies of Rocky Mountain Bighorn Sheep. **Journal of Wildlife Diseases**, v.26, n.2, p.210-213, 1990.

DUNGWORTH, D.L., Respiratory system. In: Jubb K.V.F.; Kennedy P. C.; Palmer N., Pathology of Domestic Animals, 4 ed, Academic Press, Inc., San Diego, CA. p. 613–615, 1993.

GILMOUR, N.J.L.; ANGUS, K.W.; GILMOUR, J.S. Pasteurellosis In. MARTIN, W. B.; AITKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 2ed 1991. p.133-139.

GONÇALVES, R.C. SILVA, A.A.; FERREIRA, D.O.L; MARCONDES, J.S.; PITUCO, E.M.; DIAS, A. Ocorrência do vírus parainfluenza-3, vírus respiratório sincicial, vírus da diarreia viral bovina e herpesvírus tipo 1 em rebanhos ovinos da região de Botucatu-SP. **Ciência Animal Brasileira** – Supl. 1, – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

HAINES, D.M.; CHELACK, B.J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. **Vet Diagn Invest.** v.3, p.101-112 1991.

KIMBERLING, C.V. **Jensen and Swift's Diseases of Sheep**. 3º ed., 1988, p.94.

LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R.C. Experimentally respiratory syncytial viral fection in lambs. **Am. J. Vet. Res.** v.40, n.4, p.512-514, 1979.

LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R.C. Characterization of parainfluenza type 3 virus isolated from the lung of a lamb with pneumonia. **Am. J. Vet. Res.** v.43, n. 4, p.626-628, 1982.

MARCONDES, J. S. **Estudo clínico-citológico em ovinos sadios e portadores de afecções respiratórias de ocorrência natural, utilizando-se o lavado traqueobrônquico como auxílio diagnóstico**. 2007. 107f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARTIN,W.B. Respiratory Infeccions of sheep. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**19:3, p.171-179, 1996.

PEIXOTO P.V.; MOTA R.A.; BRITO M.F.; CORBELLINI L.G. DRIEMEIER D.; SOUZA M.I. Infecção natural pelo Vírus Sincicial respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesq. Vet. Bras.** V.20, n.4, p. 171-175, 2000.

PUGH, D. G. Clínica de Ovinos e Caprinos. São Paulo: Roca, 2005 p.513.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.** 9. ed. London: W. B. Sauders, 2002. 1873p.

VIANA L. **Pesquisa de *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* e *Pasteurella multocida* em ovinos clinicamente sadios e portadores de afecções respiratórias na região de Botucatu–SP.** 2003. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

YENER, Z.; SAGLAM Y. S.; TIMURKAAN, N.; ILHAN, F. Immunohistochemical Detection of Parainfluenza Type 3 Virus Antigens in Paraffin Sections of Pneumonic Caprine Lungs. **J. Vet. Med. A.** v.52, p.268–271, 2005.

### Lista de tabelas e figuras

|           |                                                                                                                                                                                                  |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabela 01 | Correlação do diagnóstico histopatológico com a frequência de marcação por imunoistoquímica para os BPI-3 e BRSV.                                                                                |
| Quadro 01 | Achados histopatológicos e diagnóstico histopatológico, de ovinos com envolvimento pulmonar e positivos à reação por imunoistoquímica para o BPI-3 e BRSV.                                       |
| Figura 01 | Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT, espessamento dos septos alveolares, 100x.                                                                                                        |
| Figura 02 | Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT, espessamento dos septos alveolares e congestão de vasos, 50x                                                                                     |
| Figura 03 | Broncopneumonia supurativa, com hiperplasia do BALT com predomínio de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e hiperplasia de células epiteliais bronquiolares ( → ), 200x.                         |
| Figura 04 | Pneumonia abscedativa com presença de abscessos subagudos difusos e focos de infiltrado mononuclear, 50x.                                                                                        |
| Figura 05 | Imunomarcação positiva para o anticorpo BPI-3. Presença de antígenos virais do BPI-3 em células epiteliais. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-PI-3, DAB, contra-coloração hematoxilina, 25 µm, 400X. |
| Figura 06 | Imunomarcação positiva para o anticorpo BRSV. Presença de antígenos virais do BRSV em células epiteliais. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV, DAB, contra-coloração hematoxilina, 25 µm, 540X..  |
| Figura 07 | Imunomarcação positiva para o anticorpo BPI-3. Controle positivo, presença de antígenos para o BPI-3, marcação positiva no citoplasma, 25 µm, 540x.                                              |
| Figura 08 | Controle negativo para o BPI-3, ausência de antígenos do BPI-3, 25 µm, 540x.                                                                                                                     |
| Figura 09 | Controle positivo para o BRSV, presença de células com antígenos do BRSV e inclusões intracitoplasmáticas, 25µm,540x.                                                                            |
| Figura 10 | Controle negativo para o BRSV, ausência de antígenos do BRSV, 25 µm,540x.                                                                                                                        |

## **Instruções aos autores**

*Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia somente os da área de Animais Selvagens serão recebidos para submissão.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 120,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS,

RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar

dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). A digitalização deve ser na fonte Helvética, corpo 11, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou

frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas

através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

## ***CAPÍTULO 03***

Artigo Científico a ser enviado para publicação na revista Archivos de Medicina Veterinaria

**Comparação de métodos diagnósticos para doenças virais  
respiratórias em ovinos naturalmente infectados**

Julio Simões Marcondes<sup>1</sup>; Marcela Marcondes Pinto Rodrigues<sup>1</sup>;  
Andreza Amaral Silva<sup>1</sup>; Mayra Teixeira Alas Martins<sup>1</sup>; Maria Cecília Rui  
Luivizotto<sup>2</sup>; Renée Laufer Amorim<sup>1</sup>; Edviges Maristela Pituco<sup>3</sup>; Adriano Dias<sup>4</sup>  
Roberto Calderon Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

<sup>2</sup>Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico de São Paulo.

<sup>3</sup> Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba– UNESP

<sup>4</sup>Grupo de Apoio à Pesquisa, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Endereço: Distrito de Rubião Júnior, S/N, Botucatu-SP  
CEP: 18.618-970  
Fone: (14) 3811 6280  
Fax: (14) 3811 6067  
marcondesjs@yahoo.com

## RESUMO

A espécie ovina vem se desenvolvendo no Estado de São Paulo de maneira expansiva e com manejo semi-intensivo dos animais. A aglomeração de um grande número de animais por unidade de área faz com que aumente a predisposição às enfermidades, principalmente as que acometem as vias aéreas dos ovinos. Dentre os diversos agentes etiológicos que fazem parte do complexo respiratório ovino, o Vírus Sincicial Respiratório e o Parainfluenza têm demonstrado grande importância tanto como agentes precursores quanto ao sinergismo com agentes bacterianos agravando os processos respiratórios. Tais vírus estão presentes no rebanho bovino e causam infecção cruzada com animais da espécie ovina. Os diagnósticos dos processos respiratórios se fazem necessários e de maneira rápida, segura e eficiente para que medidas profiláticas sejam tomadas. Devido às dificuldades encontradas no isolamento viral, faz-se necessária a padronização de técnicas mais simples para a identificação dos agentes etiológicos nos casos de surtos de problemas respiratórios em rebanhos ovinos. Este trabalho teve por objetivos caracterizar a celularidade das vias aéreas anteriores e posteriores, realizar a sorologia para pesquisa de anticorpos contra os Vírus Sincicial Respiratório Bovino e Parainfluenza-3 bovino, e relacionar estes achados com o exame histopatológico e com a imunoistoquímica em amostras de ovinos sadios e com doença respiratória. Os animais do grupo sadio não apresentaram título para os vírus estudados, já no grupo de animais doentes notou-se 36,7% (11/30) positivos para o BPI-3 e 33,3% (10/30) para o BRSV. O exame citológico mostrou diferença significativa na distribuição de escore dos eosinófilos nas vias aéreas anteriores entre o grupo de animais sadios e com enfermidade respiratória. Detectou-se neste estudo, 83,4% de animais com pneumonia intersticial, 6,7% de broncopneumonia supurativa e 3,3% de broncopneumonia supurativa no exame histopatológico. Na técnica de imunoistoquímica foi detectada a presença de antígenos virais dos BRSV e BPI-3 em 20% e em 13,3%, respectivamente, nos animais do grupo doente.

**Palavras chave:** Parainfluenza-3 bovino, Vírus Sincicial Respiratório bovino, Ovinos, Histopatologia, Imunoistoquímica, Pulmão

## **ABSTRACT**

The sheep has been developed in São Paulo so expansive and semi-intensive management of animals. The clustering of a large number of animals per unit area will lead to increased predisposition to diseases, especially those affecting the airways of sheep. Among the other agents that are part of respiratory complex sheep, parainfluenza and respiratory syncytial virus have shown great value as precursor agents for synergism with bacterial agents aggravating the respiratory processes. Such viruses are present in cattle and cause cross-infection with ovine animals. The diagnoses of respiratory processes are needed and quickly, safely and efficiently so that preventive measures are taken. Because of the difficulties in virus isolation, it is necessary to standardize the simplest techniques for the identification of the etiologic agents in outbreaks of respiratory problems in sheep flocks. This study aimed to characterize the cellular airways before and after, perform serology for antibodies against Bovine Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza-3 bovine, and correlate these findings with histopathology and with imunoistoquímica in sheep samples healthy and respiratory disease. The animals of the sound crew did not have title to the virus studied, since the group of sick animals Nout was 36.7% (11/30) positive for BPI-3 and 33.3% (10/30) for BRSV . The Pap test showed significant difference in the distribution of scores of eosinophils in the airways between the previous group of healthy animals and respiratory disease. Was detected in this study, 83.4% of animals with interstitial pneumonia, suppurative bronchopneumonia 6.7% and 3.3% for purulent bronchopneumonia in histopathology. In immunohistochemistry detected the presence of viral antigens of BRSV and BPI-3 in 20% and 13.3% respectively in group patient.

**Keywords:** Bovine Parainfluenza-3, Respiratory syncytial virus bovine, Ovine, Histopathology, Immunohistochemistry, Lung

## INTRODUÇÃO

A região de Botucatu vem ganhando evidência no cenário do agronegócio como grande pólo da cadeia produtiva da ovinocultura paulista. De acordo com o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, existiam 13.777 ovinos na região de Botucatu em 2008, cerca de 3% do número total de ovinos presentes no estado de São Paulo (453.261 cabeças). A expansão econômica dessa atividade acaba acarretando no aumento do número de animais mantidos em confinamento e maior trânsito destes entre as propriedades, aumentando os índices de doenças respiratórias nessa espécie, que estão entre as enfermidades que ocasionam maiores perdas econômicas em rebanhos de vários países. Grande parte dos relatos de doenças respiratórias que apresentam sintomatologia clínica evidente e com alta mortalidade estão associadas a infecções por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, no entanto, outros agentes acometem os ovinos e são pouco investigados, com destaque para os vírus (PUGH, 2005).

As viroses respiratórias de maior importância econômica para a ovinocultura incluem o Vírus Parainfluenza 3 (PI-3) e o Vírus Sincicial Respiratório (RSV) (ALLEY 1975; LEHMKUHL & CUTLIP, 1982). Outras viroses, tais como o Adenovírus 6 (AVO-6), Diarréia Viral Bovina (BVDV), (POMMER & SCHAMBER, 1991), Herpesvírus tipo 1 (HV-1) e a pneumonia progressiva ovina causada pelo lentivírus maedi-visna (PUGH, 2005), podem ocorrer com menos frequência.

Dentre os vírus estudados, já foi reportada a suscetibilidade de infecção cruzada entre bovinos e ovinos pelo vírus PI-3 (STEVENSON & HORE 1970) e pelo RSV (BRYSON et al., 1988) utilizando linhagens bovinas e ovinas. No Brasil, a ocorrência de infecção, identificada pela detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação foi constatada por alguns pesquisadores para o vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), em bezerros no Estado de São Paulo (CANDEIAS E RIBEIRO, 1970;), e no Rio Grande do Sul (DAL PIZZOL et al., 1989), e em ovinos na região de Botucatu-SP (GONÇALVES et al., 2009).

Há relatos de isolamento do BRSV em bovinos criados extensivamente no Rio Grande do Sul (DRIEMEIER et al., 1997). No estado de Alagoas Peixoto et al., (2000) também isolaram o BRSV em bezerros leiteiros com problemas respiratórios apresentando alta morbidade e letalidade. Além dos casos de

BRSV detectados em estados brasileiros, foi constatada a presença do BPI-3 por isolamento em uma bezerra também no Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 2003).

Para o diagnóstico do RSV, os testes mais simples e rotineiros são os sorológicos que detectam anticorpos específicos, merecendo destaque a virusneutralização (VN), realizada em microplacas, exame que leva em média de 5 a 7 dias para ser concluído (LEHMKUHL et al., 1985; DAL PIZZOL, et al., 1989). O método clássico de diagnóstico etiológico é o isolamento viral em cultivos celulares, porém este método ainda é um desafio, pois muitas vezes é demorado e laborioso (AL-DARRAJI et al., 1982b; EVERMANN et al., 1985). Para agilizar o diagnóstico, outras técnicas como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (LARSEN et al., 1999; MASOT et al., 2000; DOMINGUES, 2005), imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidas para detecção e identificação de ácidos nucleicos e antígenos do RSV (SWENSON & KAPLAN, 1986).

A imunoistoquímica é outra opção para a identificação de diversos agentes etiológicos das viroses respiratórias, com relatos de sua utilização na detecção de antígenos do BRSV em amostras de pulmões de bovinos doentes (BRYSON et al., 1988; FLORES et al., 2000), localização tecidual de antígenos do Adenovírus Ovino (DEBEY et al., 2001) e na verificação da prevalência do PI-3 em amostras de pulmão de cabras (YENER, et al., 2005).

Tendo em vista o envolvimento desses agentes virais em processos respiratórios tanto de vias aéreas anteriores quanto posteriores, muitas vezes isoladamente acometidas, faz-se necessário a obtenção de amostras por meios simples e técnicas laboratoriais satisfatórias para o diagnóstico etiológico. Nesse contexto, o propósito deste estudo foi realizar o exame citológico de vias aéreas anteriores e posteriores de ovinos com comprometimento clínico de vias aéreas, detectados no exame clínico respiratório. Além disso, traçou-se uma relação destes achados com o diagnóstico sorológico, histopatológico e a identificação dos vírus BPI-3 e BRSV pela técnica de imunoistoquímica em fragmentos pulmonares.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Animais***

Foram utilizados 40 ovinos independentemente de raça, sexo e idade, pertencentes a propriedades rurais da região de Botucatu - SP que foram submetidos ao abate em frigorífico devidamente amparado pelas exigências legais do Serviço de Inspeção Federal.

Os ovinos foram submetidos à inspeção visual e detectadas alterações como corrimento nasal, tosse, espirros e dispnéia foram selecionados para colheita do escovado e suabes de orofaringe e porção traqueobrônquica e fragmentos pulmonares perfazendo um total de 30 animais no grupo de ovinos doentes e 10 animais sadios

Todos os animais foram submetidos à coleta de sangue, para realização de virusneutralização para pesquisa de anticorpos contra o vírus Para-Influenza tipo 3 (BPI-3) e Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV). As amostras foram processadas de acordo com a rotina e metodologia pré-estabelecidas pelo Laboratório de Virologia do Instituto Biológico de São Paulo – SP.

## **OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

### ***Amostras de Sangue***

Com o animal contido em estação foram colhidos, por venopuntura jugular, 8 ml de sangue, em tubo à vácuo com gel separador<sup>2</sup> para obtenção de soro e posteriormente os animais eram dessensibilizados e sangrados conforme o fluxograma de abate. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas ao laboratório, centrifugadas a 720 x G durante cinco minutos para obtenção de soro e processadas para realização dos exames sorológicos.

## **DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO**

### ***Pesquisa de anticorpos neutralizantes***

A pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o BPI3 foi realizada por virusneutralização, de acordo com “Code of Federal Regulations” (CFR, 2005) e BRSV segundo SAMAL et al., (1993) e Dominguez, (2000).

---

<sup>2</sup> BD Vacutainer® SST™ II Advance REF 367955

### ***Colheita de amostras citológicas e suabes***

Para obtenção de secreções do trato respiratório anterior foi utilizado o escovado nasofaríngeo, adaptado de Viana et al., (2007) e, para o trato posterior foi utilizado o escovado brônquico. Foram utilizadas escovas citológicas, adaptadas a tubo de polietileno com 80 cm de comprimento para as amostras brônquicas. Após a colheita de secreções das vias aéreas o material obtido foi dividido, onde uma porção foi destinada ao isolamento viral e a outra porção para as técnicas de citologia.

Após a dessensibilização e degola, foram separados a cabeça e o conjunto contendo traquéia, coração e pulmões. As narinas foram limpas com compressas de gaze, realizada a antissepsia do vestíbulo nasal e, para obtenção das amostras das vias anteriores, foi introduzido, pela narina esquerda, um tubo guia siliconizado com 15 cm de comprimento, utilizado para proteção da escova. Primeiramente foi introduzido através deste guia, o suabe estéril, para obtenção de amostras para isolamento viral. Após a passagem da extremidade da escova além da ponta do tubo guia foram feitos movimentos de rotação para remoção superficial de células da mucosa nasal. Para obtenção das amostras das vias aéreas posteriores, a peça anatômica foi colocada sobre a mesa e, cuidadosamente introduzidos o suabe e a escova citológica, na região de brônquios menores, para remoção de secreções e células das vias aéreas mais finas.

Após a colheita, a haste do suabe foi cortada, e a ponta contendo a secreção foi inserida em um tubo de ensaio contendo 5 mL de MEM (Meio Essencial Mínimo, Cultilab®, Campinas, Brasil), contendo penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4mg/L) e anfotericina B (0,025 mg/L) suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab®, Campinas, Brasil) e refrigerado a 4°C imediatamente. Estas amostras foram remetidas, juntamente com as amostras de sangue colhidas para sorologia, ao Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo – SP, onde foram processadas para isolamento e identificação viral.

Foram confeccionadas, por meio de impressão celular em lâmina histológica de vidro, 08 lâminas por animal, sendo quatro das vias aéreas anteriores e quatro das vias aéreas posteriores coradas pelos métodos de Giemsa para identificação e contagem celular. Duas lâminas, de cada

segmento, foram submetidas à avaliação citológica. Para a quantificação de células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos estabeleceu-se um sistema de pontuação:

- ✓ Escore 0 – Ausente (quando não foi encontrado o tipo celular pesquisado);
- ✓ Escore 1 – Raros (quando havia de uma a 05 células pesquisadas por campo);
- ✓ Escore 2 – Discreto (quando havia de 06 a 10 células por campo);
- ✓ Escore 3 – Moderado (quando havia de 11 a 40 células por campo);
- ✓ Escore 4 – Acentuado (quando havia de 41 ou mais células por campo);

#### **HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Foram retirados fragmentos de 2x2 cm em cortes transversais dos lobos anteriores que foram fixados em solução tamponada de formalina 10%. As amostras foram processadas e incluídas em parafina. Cortes histopatológicos de 3 µm foram confeccionados e corados por hematoxilina e eosina (HE). As lesões microscópicas foram classificadas em pneumonia intersticial, pneumonia fibrinosa, broncopneumonia fibrinosa e broncopneumonia supurativa de acordo com Yener et al.,(2005). Após classificação morfológica, novos cortes foram realizados para a técnica de imunoistoquímica.

A padronização da técnica de imunoistoquímica para os vírus a serem avaliados foi realizada com o complexo avidina biotina (ABC), segundo Haines & Chelak (1991). Para o BRSV foi utilizado o antissoro policlonal anti-BRSV (VMRD, Inc., Pullman, WA, USA, 210-70 BRSV) e para detecção do BPI-3 foi utilizado o antissoro policlonal anti-PI-3 (VMRD, Inc., Pullman, WA, USA, 210-70 PI-3).

Após a padronização da imunoistoquímica realizou-se as análises das amostras teste e optou-se por utilizar:

Os cortes de 3µm de espessura foram confeccionados e distendidos em lâminas silanizadas e após desparafinização e desidratação, procedeu-se a

recuperação antigênica em solução tampão citrato 10 mM (pH6,0) em microondas (700 watts) em três ciclos de três minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% em metanol com duas trocas de 10 minutos cada. Em seguida o material foi mantido durante uma hora a 27°C, em solução de leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>) a 3% em água deionizada.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida, durante 18 horas (*overnight*) a 4°C. Para o anti-BRSV utilizou-se a diluição 1:50.000 e para o anti-BPI-3 a diluição de 1:3.200.

Utilizou-se o complexo avidina biotina (ABC) (Vector<sup>®</sup>) como anticorpo secundário para a reação. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS pH 7,4 entre as etapas. Para a revelação da reação foi empregada a solução pronta para o uso de DAB (*Dako K3468*), por cinco minutos. As lâminas utilizadas para ambos os anticorpos utilizados foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas.

A avaliação imunoistoquímica foi realizada em microscópio óptico em aumento de 400X, localizando-se as lesões perivasculares, peribronquiais e peribronquiolares, com enfoque nas células epiteliais, nas lesões intersticiais e exsudato bronquiais, sendo conferido o resultado positivo ou negativo para a reação imunoistoquímica. As células foram consideradas positivas para a marcação dos vírus estudados quando se observou marcação citoplasmática de coloração acastanhada.

Os controles positivos e negativos utilizados na prova de imunoistoquímica foram preparados no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (LVB-IB, São Paulo, Brasil).

Para preparação do controle positivo inoculou-se os vírus BRSV e BPI-3 em células da linhagem MDBK. Para a replicação viral, frascos de cultivo de 150cm<sup>3</sup> com monocamada pré-formada da linhagem de células MDBK foram infectados com 0,5mL de BRSV com título 10<sup>5,0</sup>TCID<sub>50</sub>/50μL e 0,5mL de BPI-3 com título 10<sup>5,5</sup>TCID<sub>50</sub>/50μL, após uma hora de incubação à estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation; Merlette, EUA) adicionou-se 60 mL de meio MEM com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, os frascos foram novamente incubados em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente

30 horas para o BPI-3 e 146 horas para o BRSV, ocasião em que 60-70% da monocamada celular foi destruída pelo vírus. Nesse momento, a suspensão viral foi recolhida e centrifugada a 900xg por 15 minutos a 4°C. O pellet foi então fixado em formol 10% e utilizado como controle positivo. Ao contrário, para controle negativo da prova, foram utilizadas células não infectadas. (Figuras 10 a 13).

Os dados obtidos na análise citológica foram confrontados com os achados histopatológicos, da imunoistoquímica, isolamento e identificação viral.

## **DIAGNÓSTICO VIRAL**

### ***A) Células***

Os procedimentos de multiplicação, titulação, isolamento de vírus e vírusneutralização foram realizados em células da linhagem MDBK, CCL-22, provenientes do “American Type Cell Collection” (ATCC), cultivadas em MEM (Meio Essencial Mínimo, Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil), contendo penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L) e anfotericina B (0,025 mg/L) suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil).

Essa linhagem celular foi armazenada em nitrogênio líquido no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico. As células foram utilizadas por no máximo 20 passagens, conforme recomendado pelo Manual de Padrões para Testes Diagnósticos e Vacinas (OIE, 2006). Para a manutenção dos cultivos as células foram mantidas em frascos de poliestireno, com 15,0 cm<sup>2</sup> de área (Corning, New York, EUA), mantidas em estufa, a uma temperatura de 37°C.

Os subcultivos foram realizados a cada 72 horas, utilizando associação Tripsina-Versene (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) para a desagregação das células. O inóculo celular foi padronizado com  $2 \times 10^5$  células/mL e a contagem feita em câmara de Neubauer (Optik Labor, Friedrichshofen, Alemanha).

### ***B) Propagação viral***

Para a replicação viral, frascos de cultivo de 150 cm<sup>3</sup> com monocamada pré-formada da linhagem de células MDBK foram infectados com 0,5mL de BRSV com título  $10^{5,0}$ TCID<sub>50</sub>/50μL e 0,5mL de BPI-3 com título

$10^{5,5}$ TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L, após uma hora de incubação à estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation; Merlette, EUA) adicionou-se 60 mL de meio MEM com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, os frascos foram levados à estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation; Merlette, EUA) por aproximadamente 40 horas, ocasião em que 80-90% da monocamada celular foi destruída pelo vírus. Nesse momento, a suspensão viral foi recolhida e centrifugada a 900xg por 15 minutos a 4°C, para a retirada de debris celulares. O sobrenadante teve, então, sua infectividade titulada (BRSV  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/mL e PI3  $10^{5,5}$ TCID<sub>50</sub>/mL) e foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

### ***B) Titulação Viral***

Para a titulação de semente viral e suspensões virais produzidas, foi utilizada a técnica de microtitulação em placa. Foram feitas nove diluições seriadas na base 10 do vírus, começando de 10<sup>-1</sup> (1:10). Cada diluição do vírus era colocada em oito cavidades de uma coluna da placa de 96 cavidades (Corning) sendo que as duas últimas colunas (11 e 12) serviram de controle de células, por isso receberam apenas meio MEM com 1% de antibióticos (Mistura de antibióticos: Penicilina G Potássica 11.200 UI/mL; Estreptomicina 0,01 g/mL; Gentamicina 0,01 g/mL; L-Glutamina 0,029 g/mL e Anfotericina B 0,5 mg/mL). Imediatamente em seguida, à toda placa foi adicionado igual volume (50 $\mu$ L por cavidade) de uma suspensão de MDBK contendo 5% de soro fetal bovino na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL. A placa foi levada à estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas até o momento da leitura. O cálculo do título viral foi realizado utilizando-se o método de Reed e Muench (1938).

### ***C) Isolamento viral em cultivo celular***

#### **Preparo da amostra**

Os tubos contendo a secreção foram agitados por 30 segundos em agitador de tubos (Phoenix, Araraquara, Brasil) e centrifugados 900xg e o sobrenadante separado e posteriormente inoculado em monocamadas de células SFT-R. A identificação e confirmação do isolamento viral foram feitas por microscopia eletrônica em todas as amostras mesmo sem apresentar ECP após a 5ª passagem nas células SFT-R. A extração do DNA e RNA foi por TRIZOL<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as

instruções do fabricante. A identificação do BRSV foi por RT-PCR feita com oligonucleotídeos correspondentes aos genes F e G do BRSV, conforme descrito por Almeida et al. (2005) e Vilcek et al. (1994). Como controle positivo foi utilizada a estirpe do vírus BPI-3 procedentes ATCC. A identificação do BPI-3 foi por RT-PCR feita com oligonucleotídeos correspondentes ao gene F conforme Lyon et al. (1997). Como controle positivo foi usado a estirpe do BRSV procedentes ATCC.

### **Inoculação da amostra em células SFT-R**

O isolamento viral foi realizado em placas de 24 cavidades contendo monocamada de células da linhagem SFT-R, na concentração de  $2 \times 10^5$  céls/mL e com 24 horas de crescimento. O meio de crescimento foi retirado, a monocamada lavada, duas a três vezes, com meio MEM e inoculadas com 0,2 mL da suspensão de epitélio, previamente preparada. Após um período de incubação de uma hora em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, o inóculo foi retirado, lavado e adicionado um mL de meio MEM acrescido de 2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. A placa foi mantida durante 5 dias em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. A monocamada foi observada diariamente em microscópio óptico invertido para acompanhamento de efeito citopático durante cinco dias. Para cada amostra foi realizada 03 passagens consecutivas, com intervalo de cinco dias cada. incubadas durante 5 dias. Leituras diárias foram realizadas com o objetivo de visualizar efeito citopático (ECP) característico. Este procedimento foi repetido em até 05 passagens sucessivas.

### ***D) Quantificação de anticorpos pelo teste de vírusneutralização***

Os anticorpos neutralizantes presentes no soro sanguíneo foram mensurados em placas de microtitulação de poliestireno, fundo chato, de 96 cavidades (Corning). A coluna 1 da placa teste serviu como controle de células, a coluna 2 foi utilizada para controle da toxicidade de cada soro e nas colunas 3 até 12, as amostras foram diluídas em série, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:2 até 1:1024, utilizando meio MEM.

Para validação da reação, um pool de soros de animais sabidamente negativos para os vírus analisados foi usado como controle negativo enquanto que como controle positivo foi utilizado um pool de soros de animais com título

conhecido para os vírus analisados. Feita a diluição das amostras, foi adicionada à placa 200 TCID<sub>50</sub> do vírus, exceto no controle de células e de soro, colunas 1 e 2.

Na placa controle, nas colunas 1 até 8, foi feita a retrotitulação do mesmo vírus utilizado na diluição das doses infectantes. As colunas 9 e 10 serviram de controle positivo e receberam as 200 TCID<sub>50</sub> e o de controle negativo na coluna 12.

Todas as placas foram incubadas por uma hora em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois desse período receberam, em cada cavidade, igual volume de suspensão de células MDBK na concentração de  $3 \times 10^5$  células/ mL.

Após quatro dias em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> os resultados foram observados em microscópio invertido. Tendo em vista que os soros foram analisados em duplicata, os títulos de anticorpos foram expressos como o inverso da diluição que inibiu o aparecimento de ECP nas duas repetições e foram consideradas reagentes para BRSV as amostras com título igual ou superior a 4 e para PI3 soros com títulos iguais ou maiores que 8 (CFR, 2005);

O teste foi validado de acordo com os resultados do controle de células, da ausência de toxicidade dos soros teste, da manutenção do título de anticorpos de soros controle reagentes e da retrotitulação, pelo método de Reed e Muench (1938).

### ***Análise estatística***

Inicialmente, foi construído um banco de dados em planilha do Software Microsoft Excel for Windows. Neste banco foram armazenados os dados individuais dos ovinos previamente definidos e os resultados do diagnóstico citológico de vias aéreas anteriores e posteriores de ambos os grupos, da sorologia e da análise imunoistoquímica. Após conferência e validação de todos os resultados, o banco de dados foi adaptado para análise estatística no Software SAS versão 9.1.3. Para as variáveis da citologia, as comparações entre as medianas foram realizadas pelo teste exato de Fischer. Para as comparações estatísticas foi considerado o limite mínimo de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

Os sinais clínicos mais comumente observados e que auxiliaram na diferenciação dos animais para a composição do grupo de ovinos doentes foram a presença de corrimento nasal, tosse, espirros e dispnéia, detectados anteriormente ao abate.

A frequência de animais soropositivos entre as 30 amostras analisadas dos animais do grupo de animais doentes foi de 36,7% (11/30) para o BPI-3 e de 33,3% (10/30) para o BRSV. Os títulos virais variaram 16 a 1024 para o BPI-3 e de 2 a 8 para o BRSV. No grupo de animais sadios (n=10) não foi observada sorologia para os vírus pesquisados. (Tabela. 1).

**Tabela 1.** Resultados da virusneutralização para pesquisa de anticorpos contra os vírus Parainfluenza 3 e Vírus Sincicial Respiratório em ovinos com doença de vias respiratórias (n=30).

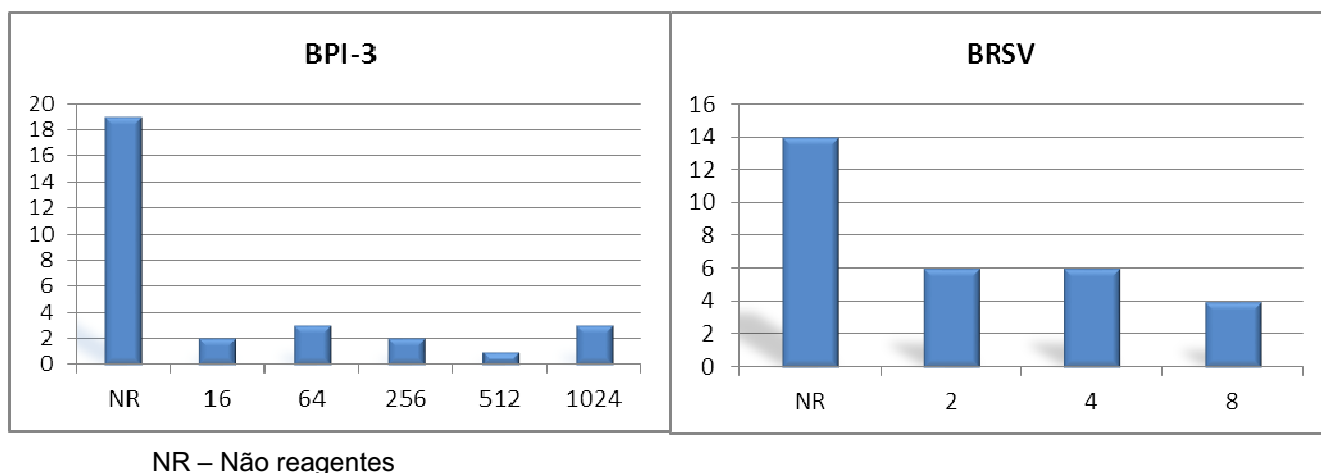
| Vírus              | Grupo doentes<br>(n=30) |           |      |
|--------------------|-------------------------|-----------|------|
|                    | Título*                 | Positivas | %    |
| BPI-3 <sup>a</sup> | 16 - 1024               | 11        | 36,7 |
| BRSV <sup>b</sup>  | 4 - 8                   | 10        | 33,3 |
| BRSV + BPI-3       | 4 - 1024                | 4         | 13,3 |

\* Título expresso como o inverso da diluição; min – mínimo; max – máximo.

<sup>a</sup> BPI-3: não reagente  $\leq$  2.

<sup>b</sup> BRSV: não reagente  $\leq$  4.

**Figura 01.** Título de anticorpos neutralizantes contra o BPI-3 e o BRSV presentes no soro dos animais doentes (n=30).



Dentro do grupo de animais doentes quatro (4/30 – 13,3%) amostras apresentaram anticorpos para o BPI-3 e BRSV concomitantemente, enquanto que 13 (13/30 – 43,3%) das amostras foram positivas apenas para um tipo viral: sete (7/30 – 23,3%) para o vírus BPI-3 e seis (6/30 – 20,0%) para o vírus BRSV (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição dos casos de co-infecção nas amostras de soro analisadas para os vírus Parainfluenza 3 (BPI-3) e Vírus Sincicial Respiratório (BRSV) em ovinos com envolvimento de vias aéreas (n=30).

| Grupo  | Infecção     | Número de Amostras (n) | Porcentagem (%) |
|--------|--------------|------------------------|-----------------|
| (n=30) | BPI-3 + BRSV | 4                      | 13,3            |
|        | BPI-3        | 7                      | 23,3            |
|        | BRSV         | 6                      | 20,0            |

O exame citológico do escovado das vias aéreas anteriores e posteriores dos grupos de animais sadios e doentes, avaliados na forma de escore, mostrou diferença estatística significativa na distribuição de escore dos eosinófilos nas vias aéreas anteriores entre o grupo de animais sadios e com

enfermidade respiratória ( $p<0,012$ ). Não houve diferença estatística significativa entre a distribuição dos escores para as vias aéreas anteriores e posteriores (Figura 02 a 05).

Nas Tabelas 3 e 4, estão apresentados os números de animais que apresentaram os diferentes escores para as células avaliadas com a respectiva porcentagem de aparecimento do escore dentro do grupo.

Em relação à distribuição dos escores de linfócitos das vias aéreas anteriores entre os grupos sadios e doentes houve tendência ao aumento destas células em vias aéreas anteriores ( $p<0,058$ ).

**Tabela 3.** Número e ocorrência dos escores para as respectivas células estudadas nas vias aéreas anteriores de ovinos sadios e doentes.

|                   |   | VIAS AÉREAS ANTERIORES |      |     |      |    |      |    |      |    |      |
|-------------------|---|------------------------|------|-----|------|----|------|----|------|----|------|
|                   |   | CEC                    |      | PMN |      | M  |      | L  |      | E  |      |
| Escore            |   | N                      | %    | N   | %    | N  | %    | N  | %    | N  | %    |
| SADIOS<br>(N=10)  | 0 | 0                      | 0    | 5   | 50,0 | 0  | 0,0  | 6  | 60,0 | 8  | 80,0 |
|                   | 1 | 0                      | 0    | 1   | 10,0 | 0  | 0,0  | 3  | 30,0 | 2  | 20,0 |
|                   | 2 | 5                      | 50,0 | 1   | 10,0 | 7  | 70,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0  |
|                   | 3 | 4                      | 40,0 | 1   | 10,0 | 3  | 30,0 | 1  | 10,0 | 0  | 0,0  |
|                   | 4 | 1                      | 10,0 | 2   | 20,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0  | 0  | 0,0  |
| TOTAL             |   | 10                     | 100  | 10  | 100  | 10 | 100  | 10 | 100  | 10 | 100  |
| DOENTES<br>(N=30) | 0 | 0                      | 0,0  | 8   | 26,7 | 0  | 0,0  | 17 | 56,7 | 30 | 100  |
|                   | 1 | 2                      | 6,7  | 7   | 23,3 | 0  | 0,0  | 8  | 26,7 | 0  | 0,0  |
|                   | 2 | 8                      | 26,7 | 4   | 13,3 | 15 | 50,0 | 3  | 10,0 | 0  | 0,0  |
|                   | 3 | 15                     | 50,0 | 5   | 16,7 | 12 | 40,0 | 2  | 6,7  | 0  | 0,0  |
|                   | 4 | 5                      | 16,7 | 6   | 20,0 | 3  | 10,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0  |
| TOTAL             |   | 30                     | 100  | 30  | 100  | 30 | 100  | 30 | 100  | 30 | 100  |

CEC - Célula Epitelial Cilíndrica; PMN - Polimorfonuclear; M - Macrófago; L - Linfócito; E - Eosinófilo  
N= número de animais

**Tabela 4.** Número e ocorrência dos escores para as respectivas células estudadas nas vias aéreas posteriores de ovinos sadios e doentes.

|         |        | VIAS AÉREAS POSTERIORES |      |     |      |    |      |    |      |    |       |
|---------|--------|-------------------------|------|-----|------|----|------|----|------|----|-------|
|         | Escore | CEC                     |      | PMN |      | M  |      | L  |      | E  |       |
|         |        | n                       | %    | n   | %    | n  | %    | n  | %    | n  | %     |
| SADIOS  | 0      | 0                       | 0,0  | 6   | 60,0 | 0  | 0,0  | 9  | 90,0 | 10 | 100,0 |
|         | 1      | 1                       | 10,0 | 1   | 10,0 | 0  | 0,0  | 1  | 10,0 | 0  | 0,0   |
|         | 2      | 2                       | 20,0 | 3   | 30,0 | 5  | 50,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0   |
|         | 3      | 6                       | 60,0 | 0   | 0,0  | 4  | 40,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0   |
|         | 4      | 1                       | 10,0 | 0   | 0,0  | 1  | 10,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0   |
| TOTAL   |        | 10                      | 100  | 10  | 100  | 10 | 100  | 10 | 100  | 10 | 100   |
| DOENTES | 0      | 0                       | 0,0  | 9   | 30,0 | 0  | 0,0  | 20 | 66,7 | 30 | 100,0 |
|         | 1      | 3                       | 10,0 | 8   | 26,7 | 0  | 0,0  | 8  | 26,7 | 0  | 0,0   |
|         | 2      | 15                      | 50,0 | 10  | 33,3 | 8  | 26,7 | 2  | 6,7  | 0  | 0,0   |
|         | 3      | 9                       | 30,0 | 1   | 3,3  | 21 | 70,0 | 0  | 0,0  | 0  | 0,0   |
|         | 4      | 3                       | 10,0 | 2   | 6,7  | 1  | 3,3  | 0  | 0,0  | 0  | 0,0   |
|         |        | 30                      | 100  | 30  | 100  | 30 | 100  | 30 | 100  | 30 | 100   |

CEC - Célula Epitelial Cilíndrica; PMN - Polimorfonuclear; M - Macrófago; L - Linfócito; E - Eosinófilo  
N= número de animais

Na Tabela 5 está apresentada a mediana do escore para cada tipo celular referente ao grupo de animais estudados.

**Tabela 5.** Mediana do escore de celularidade das vias aéreas anteriores e posteriores em ovinos sadios e portadores de doença respiratória.

|            | Anterior       |         | Posterior      |         |
|------------|----------------|---------|----------------|---------|
|            | Sadios         | Doentes | Sadios         | Doentes |
| <b>CEC</b> | 3              | 3       | 3              | 2       |
| <b>PMN</b> | 1              | 2       | 0              | 1       |
| <b>M</b>   | 2              | 3       | 3              | 3       |
| <b>L</b>   | 0              | 0       | 0              | 0       |
| <b>E</b>   | 0 <sup>a</sup> | 0       | 0 <sup>A</sup> | 0       |

Teste de Fischer's Exact Test, nível de significância  $p > 0,012$   
Letras maiúsculas e minúsculas diferem estatisticamente

Embora a mediana do escore para linfócitos tenha apresentado valor igual a zero para ambos os grupos, no grupo sadio um animal apresentou escore 3 (3) e três animais tiveram escore 1 (7,16,18) e no grupo doente dois apresentaram escore 3 (29,33), três apresentaram escore 2 (32,38,40) e oito tiveram escore 1 (2,6,12,14,19,25,31,35), apresentando tendência ao aumento destas células, porém sem significância estatística. Já para os eosinófilos houve diferença estatisticamente significativa devido ao fato de dois animais (11 e 17) do grupo sadio apresentar escore 1 contra zero animais do grupo doente com a presença de alguma célula deste tipo (ANEXO – Tabelas 1 e 2). A distribuição de celularidade das demais células das vias aéreas para os grupos estudados não mostraram diferença significativa.

Em relação ao isolamento e identificação viral, das 80 amostras testadas (40 de via aérea anterior e 40 de via aérea posterior), todas foram negativas para os dois vírus respiratórios pesquisados.

O exame histomorfológico das amostras pulmonares permitiu diferenciar o diagnóstico microscópico das enfermidades pulmonares em pneumonia intersticial, pneumonia intersticial moderada, pneumonia intersticial grave, pneumonia fibrinosa, broncopneumonia supurativa e pneumonia abscedativa crônica (Figura 06 a 09), com os achados descritos no Quadro 01 (ANEXO). A frequência dos diagnósticos nos animais do grupo doente está apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6.** Diagnóstico histopatológico das amostras pulmonares de animais do grupo doente (n=30).

| Grupo de Doentes                |    |       |
|---------------------------------|----|-------|
|                                 | n  | %     |
| Pneumonia intersticial discreta | 17 | 56,7  |
| Pneumonia intersticial moderada | 5  | 16,7  |
| Pneumonia intersticial grave    | 3  | 10,0  |
| Pneumonia fibrinosa             | 2  | 6,7   |
| Broncopneumonia supurativa      | 1  | 3,3   |
| Pneumonia abscedativa crônica   | 2  | 6,7   |
| Total                           | 30 | 100,0 |

Em relação à pesquisa de antígenos virais pela técnica de imunoistoquímica houve marcação positiva para os vírus respiratórios em 10/30 animais estudados no grupo de ovinos com envolvimento respiratório, sendo que dos positivos, 40,0% (4/10) foram positivos para o BPI-3 (Figura 14) e 60,0% (6/10) foram positivos para o BRSV (Figura 15). Não houve a presença de ambos os vírus em qualquer dos animais estudados, Tabela 7.

**Tabela 7.** Número de animais positivos para os vírus pesquisados pela técnica de imunoistoquímica.

| Vírus     | Grupo sadio<br>(n=10) |       | Grupo doentes<br>(n=30) |       |
|-----------|-----------------------|-------|-------------------------|-------|
|           | n                     | %     | n                       | %     |
| BPI-3     | 0                     | 0,0   | 4                       | 13,3  |
| BRSV      | 0                     | 0,0   | 6                       | 20,0  |
| Negativos | 10                    | 100,0 | 20                      | 66,7  |
| Total     | 10                    | 100,0 | 30                      | 100,0 |

A Tabela 8 correlaciona o diagnóstico histopatológico com a presença de marcação de antígeno viral. Onde dos 17 animais com pneumonia intersticial dois apresentaram marcação positiva para o BPI-3 e quatro positivos para o BRSV. Nos casos de pneumonia intersticial moderada houve um animal positivo para o BPI-3 e um para o BRSV e para os casos de pneumonia intersticial grave e broncopneumonia supurativa houve um animal positivo para o BPI-3 e um para o BRSV, respectivamente.

**Tabela 8.** Correlação do diagnóstico histopatológico com a frequência de marcação por imunistoquímica para os BPI-3 e BRSV.

|                                 | Diagnóstico histopatológico |       | Imunistoquímica |      |      |       |
|---------------------------------|-----------------------------|-------|-----------------|------|------|-------|
|                                 | n                           | %     | BPI-3           |      | BRSV |       |
|                                 |                             |       | N               | %    | n    | %     |
| Pneumonia Intersticial          | 17                          | 56,7  | 2               | 11,8 | 4    | 23,5  |
| Pneumonia Intersticial Moderada | 5                           | 16,7  | 1               | 20,0 | 1    | 20,0  |
| Pneumonia Intersticial grave    | 3                           | 10,0  | 1               | 33,3 | 0    | 0,0   |
| Pneumonia Fibrinosa             | 2                           | 6,7   | 0               | 0    | 0    | 0,0   |
| Broncopneumonia Supurativa      | 1                           | 3,3   | 0               | 0    | 1    | 100,0 |
| Pneumonia Abscedativa crônica   | 2                           | 6,7   | 0               | 0    | 0    | 0,0   |
|                                 | 30                          | 100,0 | 4,0             |      | 6,0  |       |

## DISCUSSÃO

A contagem diferencial das células por impressão celular do escovado das secreções das vias aéreas foi difícil, devido, principalmente à distribuição irregular do material colhido na lâmina, pouca homogenia e o grande número de sobreposições celulares. Em função disso, considerou-se para a contagem diferencial, um critério de escore de celularidade para que os resultados obtidos fossem mais fidedignos. Mesmo esta metodologia não sendo a mais utilizada para avaliação citológica em pesquisas científicas, o emprego da contagem pelo critério de escores não atrapalhou a interpretação dos resultados (Tabelas 3 e 4).

Conforme já ressaltado, muitos vírus têm sido associados a casos de doença respiratória em ovinos (ALLEY 1975; LEHMKUHL & CUTLIP, 1982; PUGH, 2005). Co-infecções de dois ou mais vírus são comuns e já foram demonstradas por vários autores (CABELLO et al., 2006; YEŞILBAĞ & GÜNGÖR, 2009). Em casos de doença respiratória, em especial de pneumonias agudas, a atividade viral é normalmente observada nos estágios iniciais da doença. Em muitos casos a infecção viral primária dá início à doença, produzindo danos ao trato respiratório que são subsequenteemente agravados por micoplasmas e infecções bacterianas secundárias (AL-DARAAJI et al., 1982a; BRYSON, 1985).

É impossível afirmar que há participação viral em todos os casos de enfermidades respiratórias. Contudo, não há dúvidas que muitos casos de doenças das vias aéreas a participação viral não foi confirmada, talvez devido ao momento impróprio da coleta (quando já não havia mais a participação de vírus, apenas de bactérias) ou pela submissão de material inadequado ou insuficiente para um diagnóstico laboratorial apropriado (BRYSON, 1985). Este fato foi sugerido por AL-Darraj et al., (1982) que conseguiram isolar o RSV em amostras de pulmões somente na fase aguda com quatro a seis dias após a inoculação viral e em amostras pulmonares.

Os resultados do levantamento sorológico mostram a presença dos vírus BPI-3 e BVSR em ovinos da região de Botucatu-SP. Os anticorpos detectados sugerem que os animais foram expostos à infecção natural por esses agentes sendo, portanto, uma evidência da circulação desses vírus em ovinos dessas propriedades (Gonçalves et al., 2009).

Como não foi possível fazer o isolamento e identificação dos vírus BPI-3 e BRSV nas amostras do trato respiratório anterior e posterior dos animais deste estudo, é admissível que a colheita tenha sido realizada em um estágio da doença em que não havia mais presença de vírus ativo causando danos ao trato respiratório, ou mesmo que o material colhido não tenha sido em quantidade suficiente ou foi inadequado para fazer o diagnóstico. Em métodos moleculares como a RT-PCR, a seleção do material biológico a ser utilizado para o diagnóstico, forma de conservação e tempo de estocagem são extremamente importantes, pois podem, facilmente, sofrer degradação do material genético principalmente nos vírus cujo genoma é constituído por RNA de fita simples (HENRICKSON , 1994; MURPHY et al., 1995; GEBARA et al., 2004).

Apesar do isolamento viral não ter ocorrido em amostras pulmonares, foi possível identificar pela imunoistoquímica a presença de antígeno viral em 33% (10/30) das amostras testadas, evidenciando a presença deste agente no rebanho ovino, isso associado à sorologia positiva nesses animais. Talvez não ocorram casos de diagnóstico destes vírus nos rebanhos ovinos pela falta de mais investigação, idade precoce de abate dos animais, não dando tempo para evolução e ou a rapidez com que se estabeleça o sinergismo da infecção viral

e bacteriana levando a casos graves de pneumonias com óbitos na propriedade.

Cabe ressaltar também que a *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* é o principal agente implicado nas doenças respiratórias de mortalidade elevada e sintomatologia clínica evidente em ovinos, além de fazer parte da flora comensal do trato respiratório superior de 95% dos ovinos adultos normais (PUGH, 2005; RADOSTITS et al., 2007; VIANA et al., 2007). Estas evidências sustentam a hipótese de que grande parte das doenças respiratórias observadas nos animais deste estudo pode estar numa fase de evolução com etiologia bacteriana, e não mais a fase viral.

Em ovinos infectados experimentalmente com *P. hemolytica* dois a quatro dias após a inoculação viral de BRSV a pneumonia é caracterizada por consolidação de parênquima pulmonar, com predomínio de macrófagos, áreas de necrose com bronquite e bronquiolite fibrinopurulenta, com células multinucleadas (AL-DARRAJI et al., 1982c), a possibilidade da interação entre agentes virais e bacterianos, pode estar evidente na amostra onde houve diagnóstico de broncopneumonia supurativa e imunomarcagem para o BRSV, que apresentou lesões semelhante às descritas na literatura.

Em bovinos a presença dos os vírus estudados já foi laboratorialmente confirmada num surto de infecção por BRSV em um rebanho de corte no estado do Rio Grande do Sul (DRIEMEIER et al., 1997), no estado de Alagoas com casos de infecção natural pelo BRSV (PEIXOTO et a., 2000) e em um caso esporádico de infecção respiratória leve por BPI-3 em uma bezerra também no Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 2003). No entanto, o isolamento não é tão simples de ser obtido, uma vez que o momento de obtenção das amostras e o período de evolução são importantes fatores no sucesso do isolamento viral.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De acordo com o que foi exposto no presente trabalho podemos concluir que há a presença de BPI-3 e o BRSV nesses rebanhos ovinos, provavelmente pelo contato desses animais com bovinos infectados, sugerindo os bovinos como importantes reservatórios do vírus. A avaliação citológica pela técnica de escovado das peças anatomopatológicas ficou prejudicada pela sobreposição

celular dificultando a contagem e a diferenciação celular, no entanto permitiu a avaliação da distribuição celular entre os grupos. Há a necessidade de associação entre técnicas de diagnóstico diretos e indiretos para a detecção da presença do agente viral no rebanho, tendo em vista que a técnica de imunoistoquímica mostrou a presença do vírus.

Os vírus estudados não foram isolados nas amostras de vias aéreas anteriores e posteriores dos animais com sintomatologia de envolvimento pulmonar, no entanto, nos animais onde a IHC foi positiva houve a presença de antígenos dos vírus nas células do aparelho respiratório, embora sem vitalidade para crescer no cultivo. Apesar disso, há necessidade de mais estudos dos problemas respiratórios em ovinos, em vista de sua importância cada vez maior como fonte de proteína e de renda no país.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA RS, FR SPILKI, M PAULO, PM ROEHE, CW ARNS. 2005. Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction in experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 105, 131-135.

AL-DARRAJI AM, RC CULTLIP, HD LEHMKUHL, DL GRAHAM. 1982. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: Pathologic studies. *Am J Vet Res* 42, 224-229.

AL-DARRAJI AM, RC CULTLIP, HD LEHMKUHL. 1982a Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: immunofluorescent and electron microscopic studies. *Am J Vet Res* 42, 230-235.

AL-DARRAJI, AM.; RC CULTLIP, HD LEHMKUHL, DL GRAHAM, JP KLUGE, GH FRANK. 1982b. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: Clinical and microbiologic studies. *Am J Vet Res* 42 236-240.

ALLEY MR. 1975. The bacterial flora of the respiratory tract of normal and pneumonic sheep. *N Z Vet J* 23 113-118.

BRYSON DG. 1985. Calf pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1 237-57.

BRYSON DG, JF EVERMANN, H DENNY LIGGITT, WJ FOREYT, RG BREEZE. 1988a. Studies on the pathogenesis and interspecies transmission of respiratory syncytial virus isolated from sheep. *Am J Vet Res* 49, 1424-1430.

CABELLO KR, RCH QUISPE, HG RIVERA. 2006. Frecuencia de los virus parainfluenza-3, respiratorio sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco. *Rev Investig Vet Peru* 17, 167-172.

CANDEIAS JAN, LC RIBEIRO. 1970. Anticorpos inibidores da hemaglutinação para as cepas SF-4 e HA-1 de Myxovirus parainfluenza-3, em gado bovino do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico* 37, 129-35.

CODE OF FEDERAL REGULATION. Title 9. Animals and animal products. 2005. Chapter 1. Animal and plant health inspection service, USDA. Part 113.216. Disponível em: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_05/9cfr113\\_05.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_05/9cfr113_05.html). Acesso em 08 mai 2005.

DAL PIZZOL M, AP RAVAZZOLO, JCT FERNANDES, V MOOJEN. 1989. Detecção de anticorpos para o vírus Parainfluenza-3 em bovinos e ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. *Arq Fac Vet UFRGS*, 17, 59-64.

DEBEY B M, HD LEHMKUHL, C CHARD-BERGSTROM, L A HOBBS. 2001. Ovine Adenovirus Serotype 7–associated Mortality in Lambs in the United States. *Vet Pathol* 38, 644–648.

DOMINGUEZ HG. 2000. Vírus respiratório sincicial bovino: padronização e comparação de técnicas sorológicas. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas, SP.

DRIEMEIER D, MJP GOMES, V MOOJEN, CW ARNS, G VOGG, L KESSLER, UM COSTA. 1997. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no rio grande do sul, Brasil. *Pesq Vet Bras* 17, 77-81.

EVERMANN JF, HD LIGGITT, SM PARISH, ACS WARD, BR LEAMASTER. 1985. Properties of a respiratory syncytial virus isolated from sheep with rhinitis. *Am J Vet Res* 46, 947-951.

FLORES EF, R WEIBLEN, M MEDEIROS, SA BOTTON, LF IRIGOYEN, D DRIEMEIER, LF SCHUCH, M MORAES. 2000. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Pesq Vet Bras* 20, 139-143.

GEBARA CMS, RS WOSIACKI, FJ NEGRÃO, BD OLIVEIRA, SNE BELONI, AA ALFIERI, AF ALFIERI. 2004. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. *Arq Bras Med Ve. Zootec* .56, 4.

GONÇALVES DA, RV SPILKI, C CHIMINAZZO, MA OLIVEIRA, AC FRANCO, PM ROEHE. 2003. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* .33, 953-956.

GONÇALVES RC; AA SILVA, DOL FERREIRA, JS MARCONDES, EM PITUCO, A DIAS. 2009. Ocorrência do vírus Parainfluenza-3, Vírus respiratório sincicial, Vírus da diarreia viral bovina e Herpevírus tipo 1 em rebanhos ovinos da região de Botucatu-SP. *Ciência Animal Brasileira Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria* 563-568.

HAINES DM, BJ CHELACK.1991. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *Vet Diagn Invest* 3, 101-112.

HENRICKSON, KJ. 1994. Lower respiratory viral infection in immunocompetent children. *Adv Pediatr Infect Dis* 9, 59-96.

LEHMKUHL HD, RC CUTLIP. 1982. Characterization of parainfluenza type 3 virus isolated from the lung of a lamb with pneumonia. *Am J Vet Res* 43, 626-628.

LARSEN LE, K TJØRNEHØJ, B VIUFF, NE JENSEN, A UTTENTHAL. 1999. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. *J Vet Diagn Invest* 11, 416–422.

LEHMKUHL HD, RC CUTLIP, SR BOLIN, KA BROGDEN. 1985. Seroepidemiologic survey for antibodies to select viruses in the respiratory tract of lambs. *Am J Vet Res* 46, 2601-2604.

LYON M, C LEROUX, T GREENLAND, J CHASTANG, J PATET, JF MORNEX. 1997. Presence of a unique parainfluenza vírus 3 strain identified by RT-PCR in visna-maedi vírus infected sheep. *Vet Microbiol* 51,95-104.

MASOT AJ, CL KELLING, O LÓPEZ, JH SUR, E REDONDO. 2000. In situ hybridization detection of bovine respiratory syncytial virus in the lung of experimentally infected lambs. *Vet Pathol* 37, 618–625.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. *Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals* . 5 th Ed., 2004. Paris: OIE. Disponível em <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00056.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00056.htm)> Acesso em: 30 set. 2006.

PEIXOTO PV, RA MOTA, MF BRITO, LG CORBELLINI, D DRIEMEIER, MI SOUZA. 2000. Infecção natural pelo Vírus Sincicial respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. *Pesq Vet Bras* 20, 171-175.

POMMER J, G SCHAMBER. 1991. Isolation of adenovirus from lambs with upper respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 3, 204-210.

PUGH DG. 2005. Clínica de Ovinos e Caprinos. São Paulo: Roca, p. 513.

RADOSTITS OM; CC GAY, KW HINCHCLIFF, PD CONSTABLE. 2007. Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10ed. Saunders Elsevier, Saint Louis, USA, 2156.

REEDY JR, H MUENCH. 1938 A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27.

SAMAL SK, MK PASTEY, TH MCPHILLIPS, DK CARMEL, SB MOHANTY. 1993. Reliable Confirmation of Antibodies to Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using BRSV Nucleocapsid Protein Expressed in Insect Cells. *J Clin Microbiol* 31, 3147-3152.

STEVENSON RB, DE HORE. 1970. Comparative pathology of lambs and calves infected with parainfluenza virus type 3. *J Comp Path* 80, 613-618.

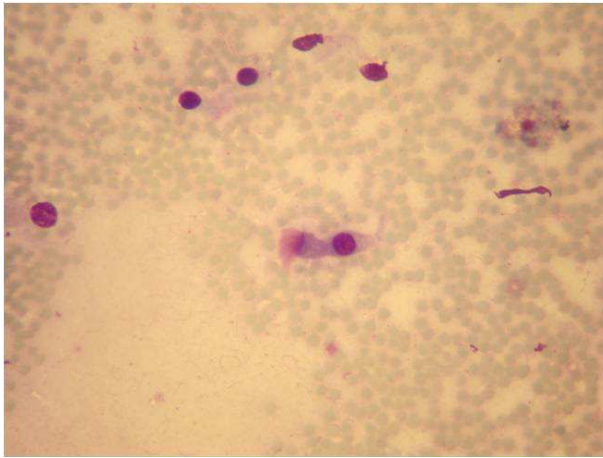
SWENSON PD, MH KAPLAN. 1986. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by a commercial enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 23, 485-488.

VIANA L, RC GONÇALVES, JP OLIVEIRA FILHO, AC PAES, RM AMORIM. 2007. Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em ovinos sadios e com enfermidade respiratória. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59, 1579-1582.

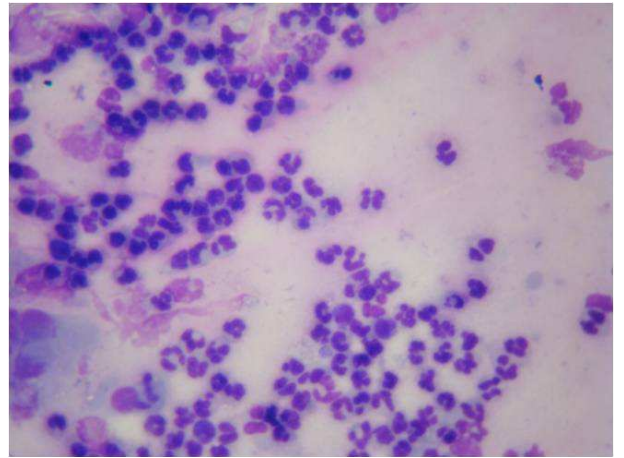
VILCEK S, M ELVANDER, AB PORDANY, S BELAK. 1994. Development of Nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J Clin Microbiol* 32, 2225-223.

YENER Z, K GÜRTÜRK, MY GÜLBAHAR, H SOLMAZ. 2005. Pathological and bacteriological studies on pneumonia in goats slaughtered at Bitlis slaughterhouse. **Vet Bil Derg** 17, 13-20.

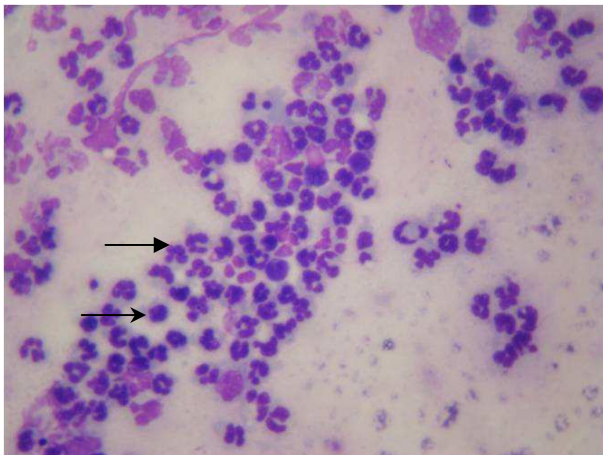
YEŞİLBAĞ K, B GÜNGÖR. 2009. Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in North-Western Turkey. **Trop Anim Health Prod** 41, 421–425.



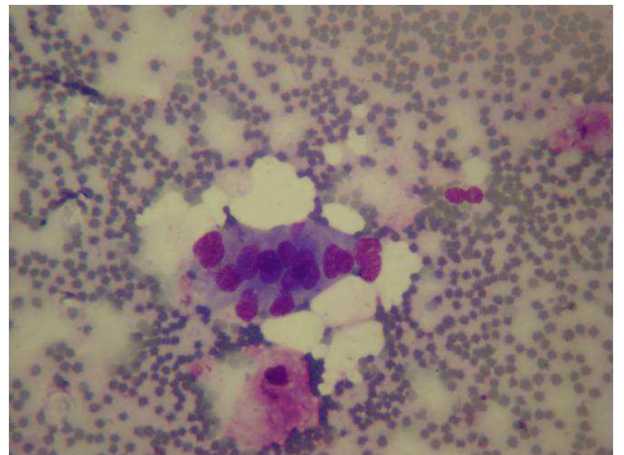
**Figura 02.** Células do escovado de nasofaringe de ovinos portadores de doença respiratória. Célula cilíndrica ciliada (escore = 1), Giemsa, 400x.



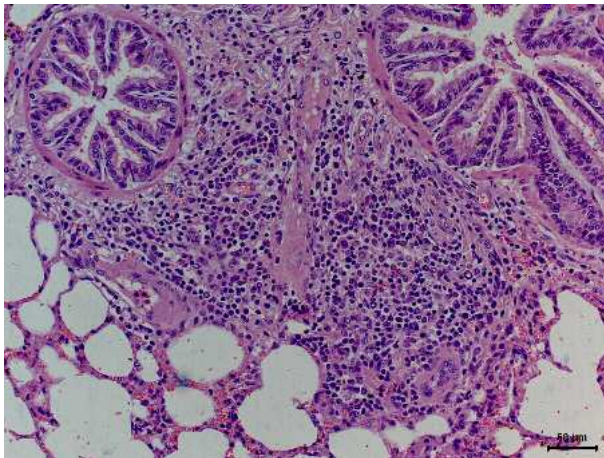
**Figura 03.** Broncopneumonia supurativa. Acúmulo de neutrófilos em vias aéreas anteriores. (escore = 4), Giemsa, 400x..



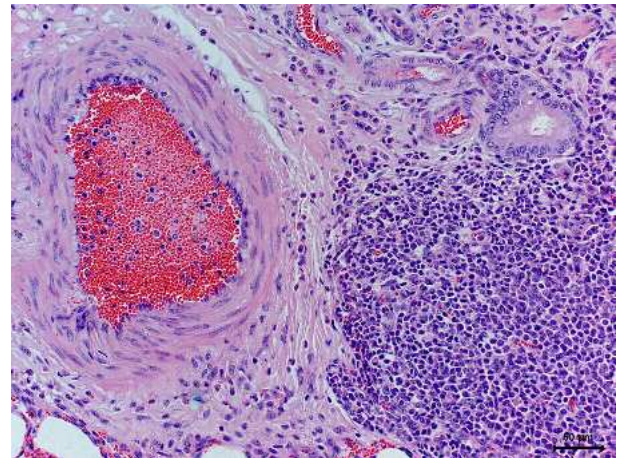
**Figura 04.** Pneumonia intersticial grave. Acúmulo de Neutrófilos (escore = 4) ( —→ ) e Macrófagos (escore = 2) ( —→ ) em escovado traqueobrônquico, Giemsa, 400x..



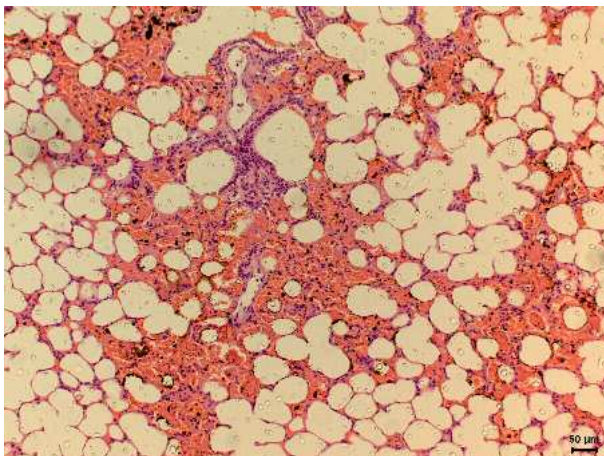
**Figura 05.** Pneumonia intersticial moderada. Presença de Célula Gigante (escore = 1) em escovado traqueobrônquico, Giemsa, 400x..



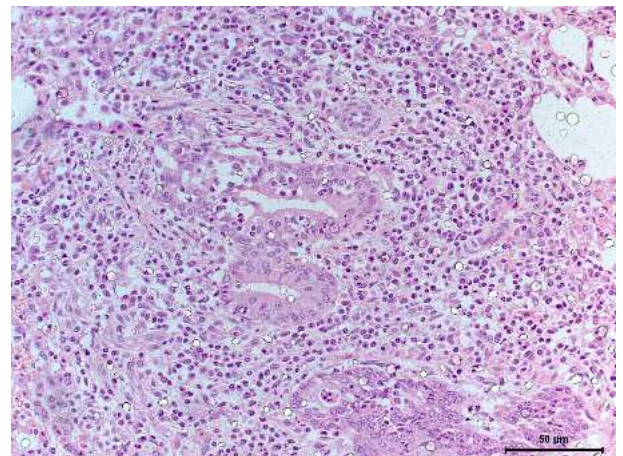
**Figura 06.** Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT, com predomínio de mononucleares, animal positivo à IHC para o BPI-3, H.E., 200x.



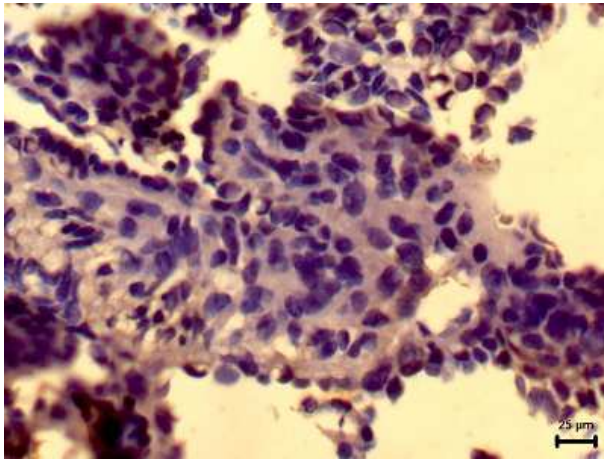
**Figura 07.** Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT e infiltrado perivascular com predomínio de mononucleares, H.E. 200x.



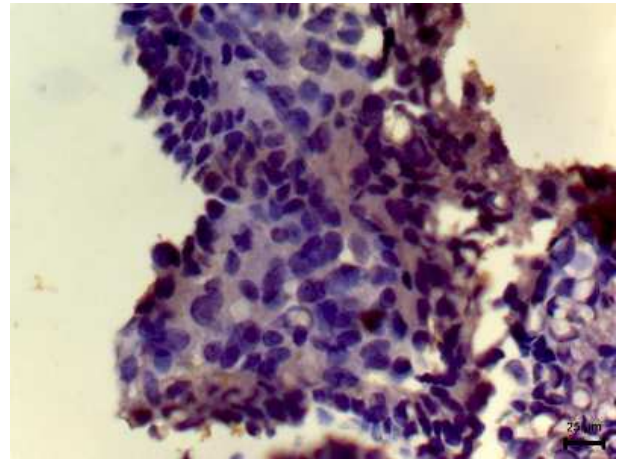
**Figura 08.** Pneumonia fibrinosa, com hemorragia e áreas congestivas, H.E, 100x.



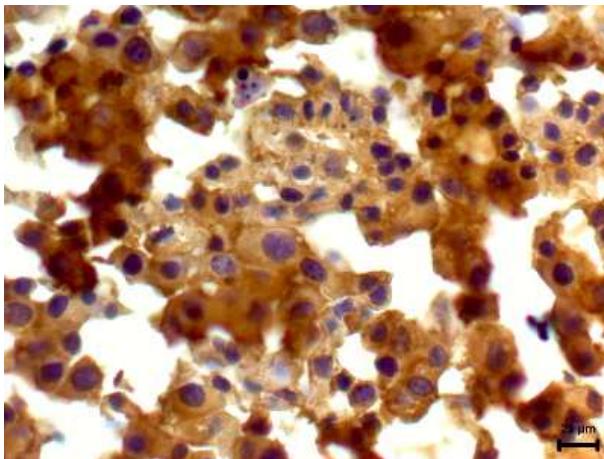
**Figura 09.** Broncopneumonia supurativa com infiltrado misto de mono e PMN, animal positivo à IHC para o BRSV, H.E, 100x.



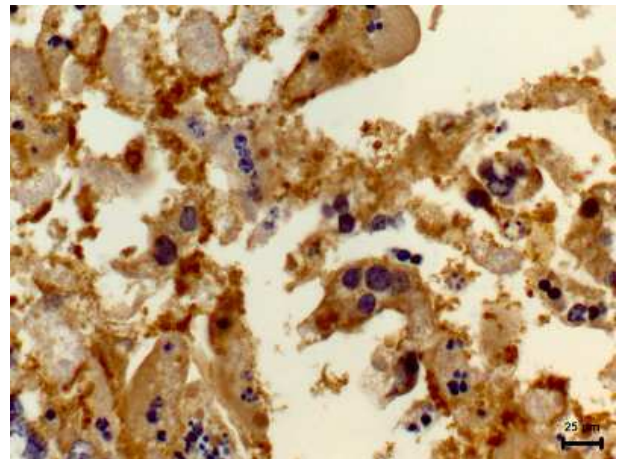
**Figura 10.** Controle negativo para o BRSV, ausência de antígenos do BRSV, 25μm, 540x.



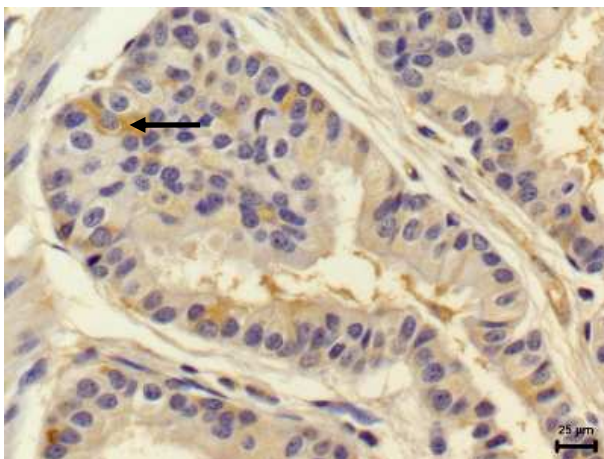
**Figura 11.** Controle negativo para o BPI-3, ausência de antígenos do BPI-3, 25μm, 540x.



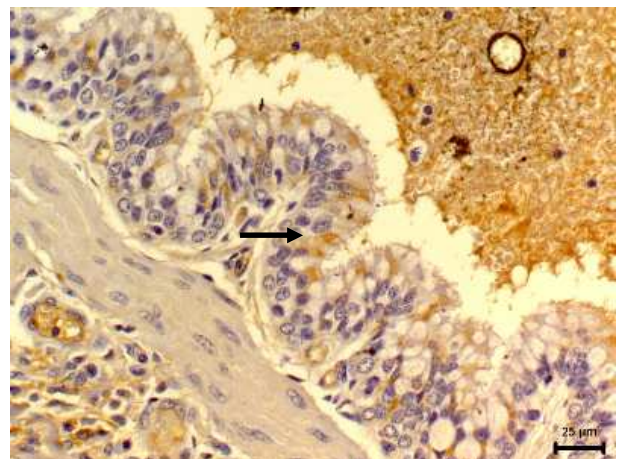
**Figura 12.** Controle positivo para o BRSV. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV contra coloração hematoxilina, 25μm, 400x.



**Figura 13.** Controle positivo para o BPI-3. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BPI-3 contra coloração hematoxilina, 25μm, 400x.



**Figura 14.** Célula epitelial cilíndrica positiva para o BPI-3 em bronquíolos de animal com pneumonia intersticial severa. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BPI-3 contra coloração hematoxilina, 25μm, 540x.



**Figura 15.** Células epiteliais cilíndricas positivas para BRSV em brônquios de animal com pneumonia intersticial. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV contra coloração hematoxilina, 25μm, 400x.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabela 1</b>  | Resultados da virusneutralização para pesquisa de anticorpos contra os vírus Parainfluenza 3 e Vírus Sincicial Respiratório em ovinos sadios e com doença de vias respiratórias (n=40).             |
| <b>Tabela 2</b>  | Distribuição dos casos de co-infecção nas amostras de soro analisadas para os vírus Parainfluenza 3 (BPI-3) e Vírus Sincicial Respiratório (BRSV) em ovinos com envolvimento de vias aéreas (n=30). |
| <b>Tabela 3</b>  | Número e ocorrência dos escores para as respectivas células estudadas nas vias aéreas anteriores de ovinos sadios e doentes.                                                                        |
| <b>Tabela 4</b>  | Número e ocorrência dos escores para as respectivas células estudadas nas vias aéreas posteriores de ovinos sadios e doentes.                                                                       |
| <b>Tabela 5</b>  | Mediana do escore de celularidade das vias aéreas anteriores e posteriores em ovinos sadios e portadores de doença respiratória.                                                                    |
| <b>Tabela 6</b>  | Diagnóstico histopatológico das amostras pulmonares de animais do grupo doente (n=30).                                                                                                              |
| <b>Tabela 7</b>  | Número de animais positivos para os vírus pesquisados pela técnica de imunoistoquímica.                                                                                                             |
| <b>Tabela 8</b>  | Correlação do diagnóstico histopatológico com a frequência de marcação por imunoistoquímica para os BPI-3 e BRSV.                                                                                   |
| <b>Figura 01</b> | Título de anticorpos neutralizantes contra o BPI-3 e o BRSV presentes no soro dos animais doentes (n=30).                                                                                           |
| <b>Figura 02</b> | Visão panorâmica de células da citologia de nasofaringe de ovinos portadores de doença respiratória. Célula cilíndrica ciliada (escore = 1).                                                        |
| <b>Figura 03</b> | Visão panorâmica de células em vias aéreas anteriores de animal com broncopneumonia supurativa. Acúmulo de neutrófilos (escore = 4).                                                                |
| <b>Figura 04</b> | Acúmulo de Neutrófilos (escore = 4) e Macrófagos (escore = 2) em escovado traqueobrônquico em animal com pneumonia intersticial grave.                                                              |
| <b>Figura 05</b> | Presença de Célula Gigante (escore = 1) em escovado traqueobrônquico de animal com pneumonia intersticial.                                                                                          |
| <b>Figura 06</b> | Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT, com predomínio de mononucleares, animal positivo à IHC par o BPI-3, 200x.                                                                           |
| <b>Figura 07</b> | Pneumonia intersticial com hiperplasia do BALT e infiltrado perivascular focal com predomínio de mononucleares, 200x                                                                                |
| <b>Figura 08</b> | Pneumonia fibrinosa, presença de congestão com hemorragia e áreas congestivas, 10x.                                                                                                                 |
| <b>Figura 09</b> | Broncopneumonia supurativa com infiltrado misto de mono e PMN, animal positivo à IHC para o BRSV, 100x.                                                                                             |
| <b>Figura 10</b> | Controle negativo para o BRSV, ausência de antígenos do BRSV, 25µm,540x.                                                                                                                            |
| <b>Figura 11</b> | Controle negativo para o BPI-3, ausência de antígenos do BPI-3, 25µm, 540x.                                                                                                                         |
| <b>Figura 12</b> | Controle positivo para o BRSV. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV contra coloração hematoxilina, 25µm,400x.                                                                                         |
| <b>Figura 13</b> | Controle positivo para o BPI-3. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BPI-3 contra coloração hematoxilina, 25µm, 400x..                                                                                     |
| <b>Figura 14</b> | Célula epitelial cilíndrica positiva para o BPI-3 em bronquíolos de animal com pneumonia intersticial severa. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BPI-3 contra coloração hematoxilina, 25µm, 540x.        |
| <b>Figura 15</b> | Células epiteliais cilíndricas positivas para BRSV em brônquios de animal com pneumonia intersticial. Imunoistoquímica, ABC, 210-70-BRSV contra coloração hematoxilina, 25µm, 400x.                 |

Instruções aos autores  
***Archivos de Medicina Veterinaria***

**Tipos de artículos**

**Artículos de revisión:** son realizados por expertos que resumen y proyectan el conocimiento actualizado en un campo particular en las Ciencias Veterinarias, y no necesariamente se ajustan a un formato definido de presentación. Los autores deberían previamente consultar a los editores antes de iniciar el trabajo de revisión. El Comité Editor podrá solicitar a expertos el envío de artículos de revisión, los que también serán sometidos al proceso de arbitraje y edición. No deben exceder de 30 páginas, incluidos cuadros, figuras y referencias.

**Artículos científicos:** éstos informan un nuevo avance en Ciencias Veterinarias basados en una investigación original. El formato de ellos deberá incluir summary, introducción, material y métodos, resultados, discusión, resumen, agradecimientos (cuando corresponda) y referencias. No deben exceder de 20 páginas, incluidos cuadros, figuras y referencias.

**Comunicaciones cortas:** informan de manera breve un avance, resultado de un experimento, observaciones clínicas o nueva metodología, ajustándose al siguiente formato: summary, introducción, material y métodos, resultados y discusión (sección conjunta), resumen, agradecimientos (cuando corresponda) y referencias. No deben exceder de 12 páginas, incluidos cuadros, figuras y referencias.

**Estilo y formato de la revista**

**Presentación general:** la revista publica artículos en español o inglés.

Los artículos deberán ser escritos con letras Times New Roman 12, por un solo lado de las hojas, a interlineado y medio, en tamaño carta (21,5 x 27,9 cm), dejando un margen de 2 cm en los cuatro bordes.

Todas las páginas deben ser numeradas de manera consecutiva en el ángulo superior derecho, y las líneas deberán ser numeradas en cada página, iniciándose con el número 1, junto al margen izquierdo, en todo el trabajo.

Los títulos de capítulos deben ser escritos en mayúscula, justificados al lado izquierdo, en líneas separadas y sin punto final. Ejemplo: MATERIAL Y METODOS. En los subtítulos sólo la primera letra es mayúscula. (Ejemplo:

Diseño experimental) y deberá ser justificado al lado izquierdo. Subtítulo secundario debe ser justificado al lado izquierdo y en letra **cursiva**. No deberán usarse subrayado ni numeración de subtítulos o lista de ítemes.

Las cifras deben ser escritas en números. Cuando están al inicio de una frase, o cuando la claridad del texto lo requiera, deben ser expresadas en palabras. Un decimal deberá ser precedido de un numeral usando punto cuando el artículo es en inglés o coma cuando el artículo es en español (Ejemplo: 0,5 no ,5). Múltiplos de mil deben escribirse separados por punto (Ejemplo: 1.000). Las medidas de cantidad deberán ajustarse al Sistema Internacional de Unidades, a menos que la práctica en una disciplina use derivados de ellos (Ejemplo: la unidad internacional de Curie). Las fechas deben ser expresadas como “07 de septiembre de 1954” en el texto, pero pueden presentarse abreviadas en los cuadros y figuras. El tiempo diario se debe expresar según las 24 horas cronológicas (Ejemplo: 13:00 h).

Para la nomenclatura química se deben utilizar las normas de la Sociedad de Bioquímica (Biochem J 209, 1-27, 1983), los fármacos o drogas deben ser mencionados por sus nombres genéricos (en minúsculas), si es necesario colocar marcas y sus fuentes deberán ir a pie de página. Las enzimas deben ser identificadas, cuando se mencionan por primera vez, según la Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry.

Los términos en latín y sus abreviaciones que son de uso común en la literatura científica, tales como: **in vitro**, **in vivo**, **ad libitum** deberán ir en **cursiva**. Los valores de probabilidad deben ser dados en la forma de  $P < 0,05$  o  $P < 0,01$ . Desviación estándar, error estándar de la media e intervalos de confianza, se abreviarán en la forma siguiente: DE, EE y IC, respectivamente.

### **Título**

El título del trabajo debe ser conciso, específico e informativo. Sólo la primera letra será mayúscula, en negritas, centrado, iniciándose en la línea 10, sin usar marcas comerciales o abreviaciones. Se deberá señalar, con superíndice (#) la fuente de financiamiento, si lo hubiese, que se detallará a pie de página. Separado por el espacio de una línea se deberá escribir el título en inglés.

### **Autores y direcciones**

Los nombres de los autores se escribirán bajo el título separados por un espacio. Use iniciales (sin puntos) y apellido separando por comas entre los autores, ajustándose al siguiente ejemplo: CT Westwood, E Bramley, IJ Lean. Al término de cada nombre de autor debe identificarse con una letra en superíndice, el nombre de la sección, departamento, servicio o institución a la que pertenece o perteneció dicho autor, durante la ejecución del trabajo. La letra con un asterisco indica el autor responsable de la correspondencia, debiéndose señalar a pie de página el número de fax, correo electrónico y casilla de correo.

### **Pie de página**

Serán usados para elaborar abreviaciones citadas en el título de cuadros, marcas comerciales, nombre y dirección de empresas o cuando se deba señalar la fuente de financiamiento. Deben ser indicados con números.

### **Summary**

La segunda página debe contener un summary, de no más de 250 palabras y que describa los propósitos del estudio o investigación, el material y métodos empleados, los resultados principales y las conclusiones más importantes. No se deben emplear abreviaturas no estandarizadas. En línea aparte, separado por un espacio y justificadas a la izquierda se deben incluir **key words** en minúsculas, las que no deben ser más de 4.

### **Introducción**

En la tercera página en la línea 1 se escribirá el título del capítulo. En la línea siguiente, con sangría, predeterminada de un tabulador en 5 espacios, se plantearán los antecedentes que sustentan el propósito del artículo, sin un despliegue extensivo del tema y utilizando sólo las referencias más pertinentes. Se deben indicar, cuando corresponda, la hipótesis que se postula y los objetivos de la investigación.

Entre párrafos debe conservar el interlineado y medio.

### **Material y Métodos**

Separado por un espacio de la sección anterior, se deberá describir el capítulo con suficientes detalles para permitir a otros repetir el estudio. Después de la primera referencia en el texto a drogas o reactivos, se deben señalar el nombre genérico, dosis y vía de administración. Para el caso de

equipo especializado se indicarán la marca, el modelo y el nombre del fabricante.

Los métodos estadísticos utilizados deben ser señalados como subtítulos: “Análisis estadístico” y deben incluir un adecuado detalle, que permita a los lectores establecer con precisión cómo han sido analizados y presentados los datos y las unidades de medidas en que están expresadas (medias aritméticas, desviaciones estándares, errores estándares de la media, medianas, rangos o límites de confianza, etc.). Si las pruebas usadas fueron paramétricas (Chi cuadrado, prueba “t” de Student, Anova, etc.) o no paramétricas (Wilcoxon, Kruskal-Wallis, etc.). Se deberán identificar el nombre, la versión y el proveedor del programa computacional utilizado, ejemplo: SPSS versión 9.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago IL, USA).

### **Resultados**

Separado por el espacio de una línea de la sección anterior, se deberá describir el capítulo de resultados, presentado en forma concisa y lógica, sin discusión o referencia a otro trabajo. Los cuadros y figuras deben ser los mínimos necesarios y los datos no deben ser repetidos en el texto y tampoco deberán ser mostrados simultáneamente o reiterados.

### **Discusión**

Esta sección, separada por una línea de la anterior, debe evaluar e interpretar los resultados, relacionándolos a los de otros estudios relevantes. No debe repetir resultados o presentar nuevos. Debe ser diligentemente tratada en su desarrollo, haciéndola de manera lógica y concisa, estableciendo conclusiones, relevancias y proyecciones del trabajo. Debe evitarse formular conclusiones que no estén respaldadas con sus hallazgos ni sustentadas en trabajos aún no publicados.

### **Resumen**

El resumen en español deberá ser escrito en hoja aparte, y deberá ajustarse a las mismas normas señaladas para el summary. Separadas por el espacio de una línea se deberán escribir las palabras clave en letras minúsculas, no debiendo ser más de cuatro y justificadas en el lado izquierdo.

## **Agradecimientos**

Deben ser breves y sólo incluir personas o instituciones que han hecho una contribución directa, han provisto material necesario o dado las facilidades para la realización del estudio.

## **Referencias**

La precisión con la que son señaladas las referencias es de responsabilidad de los autores y deben corresponder al artículo original; asegúrese que todos los artículos citados en el texto estén incluidos en el listado de referencias y viceversa. En el texto, las citas se deben indicar entre paréntesis y en orden cronológico, citando el apellido del autor y la expresión “y col” después del apellido del primer autor, cuando son más de dos, Ej.: (Pérez 1994, Castro y Martínez 1996, Cifuentes y col 2002).

El listado de referencias debe ir en orden alfabético de acuerdo al apellido del primer autor y debe incluir el apellido e iniciales de todos los autores. Cuando no se dispone del nombre del autor, use el término anónimo entre comillas, tanto en el texto como en el listado de referencias. Las referencias, cuando son del mismo autor, solo o con más autores, deben ser escritas en orden cronológico. Las letras a, b, c, etc., deberían ser agregadas como superíndice cuando un autor escribe más de un trabajo en el mismo año. Los nombres de los autores deben escribirse en minúsculas, sin punto entre las iniciales. Los nombres de las revistas y de los libros deben ser en letra cursiva, usando la abreviatura estandarizada. Use los siguientes ejemplos como guía.

### **Para artículos en revista:**

Matamoros R, C Gómez, M Andaur. 2002. Hormonas de utilidad diagnóstica en medicina veterinaria. *Arch Med Vet* 34, 167-182.

Severino G, M del Zompo. 2004. Adverse drug reactions: role of pharmacogenomics. *Pharmacol Res* 49, 363-373.

### **Para capítulos en libros o publicaciones ocasionales:**

Horneck DA, RO Miller. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In: Kalra YP (ed). *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. 2nd ed. CRC Press, Washington DC, USA, Pp 75-83.

Flórez J. 1992. Fármacos analgésicos opiáceos. En: Flórez J (ed). *Farmacología Humana*. 2ª ed. Masson-Salvat, Barcelona, España, Pp 25-28.

WHO, World Health Organization. 1972. International Drug Monitoring: The role of national centres. *Tech Rep Ser WHO* N° 48.

SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 1996. Resolución Exenta N° 3599 del 29 de noviembre de 2006.

Weinstein L, MN Swartz. 1974. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA (eds). *Pathogenic physiology: Mechanism of Disease*. WB Saunders, Philadelphia, USA, Pp 457-472.

**Para artículos y resúmenes publicados en series regulares:**

Contreras PA, V Ruiz, F Wittwer, H Böhmwald. 1998. Valores sanguíneos de triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en vacas lecheras del sur de Chile. *Resúmenes del X Congreso Chileno de Medicina Veterinaria*, Valdivia, Chile, Pp 135-136.

**Para memoria de título:**

Matthei SM. 2002. Determinación de la presencia del receptor del factor activante plaquetario en membranas de neutrófilos de bovino. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.

**Para tesis:**

Vilanova LT. 2002. Presencia y funcionamiento del receptor GM-CSF en espermatozoides bovinos y su relación con la motilidad espermática. *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.

Minimice el uso de resúmenes como referencias. Evite usar “datos no publicados” o “comunicación personal” al menos que de ello exista una forma escrita. Si esto ocurriera, debe hacerse referencia en el texto, pero no debe aparecer en el listado de referencias. Las referencias a trabajos que han sido aceptados para publicación deben ser citados como “en prensa”; sin embargo, trabajos que han sido sometidos a publicación, pero no han sido aceptados todavía, deben ser referidos como “datos no publicados”.

Direcciones de páginas Web no deben ser incluidas en las referencias; si su uso es imprescindible, la dirección debe ser señalada en el texto como pie de página, incluyendo fecha de consulta.

## **Instrucciones complementarias**

### **Cuadros**

Las leyendas de los cuadros y figuras deben presentarse en español e inglés.

Los cuadros deben ser el menor número posible, presentados en hoja aparte, con sus respectivos títulos en español e inglés en la parte superior. La información de los cuadros no debe repetir lo del texto. Los cuadros deben ser numerados consecutivamente con números arábigos, en el orden en que aparecen en el texto, asignándoseles un título breve y autoexplicativo que indique su contenido. Sobre cada columna del cuadro debe colocarse un encabezamiento corto o abreviado. Sólo los encabezamientos de las columnas y los títulos generales se separan con líneas horizontales. Las columnas de datos deben separarse por espacios y no por líneas verticales. Cuando se requieran notas aclaratorias, deben agregarse al pie del cuadro. Las notas aclaratorias para todas las abreviaturas no estándar y las unidades de medidas deben ser agregadas entre paréntesis. Si se usan superíndices para señalar diferencias entre valores use a, b, c, minimice el número de dígitos en cada columna. Informe el valor de cero como 0. El ancho máximo de los cuadros no debe exceder los 80 mm para una columna, o los 170 mm para dos columnas.

### **Figuras**

Las figuras deben ser presentadas en hojas separadas con sus respectivos títulos en español e inglés en la parte inferior y numeradas consecutivamente usando números arábigos, según el orden en que aparecen en el texto. Ej.: Figura 1, no Fig. 1. Denomine figura a cualquier ilustración que no sea cuadro, Ej.: gráficos, radiografías, electrocardiogramas, fotografías, etc. Las figuras deben ser orientadas verticalmente y acompañadas de una corta descripción que contenga la explicación de todos los marcadores, líneas y símbolos usados. Si la figura tiene secciones, éstas deben ser identificadas como a, b, c, etc., en la esquina superior derecha y deberán ser descritas en la leyenda.

Para el caso de fotografías, en el reverso y con lápiz a carbón, deben señalarse con flecha la orientación espacial, el número de la figura y el nombre del autor principal. Los símbolos, flechas o letras, empleados en las fotografías, deben tener un tamaño y contraste suficientes para distinguirlos de su entorno.

Envíe las figuras protegidas en un sobre grueso y de tamaño apropiado. Las figuras pueden diseñarse a una o dos columnas de ancho (80 y 170 mm, respectivamente). Las reproducciones en colores de las figuras deben ser financiadas por los autores.

Cuando las figuras no son originales debe señalarse la autoría, y cuando corresponda, se debe adjuntar la autorización del autor para ser reproducidas.

### **Pruebas de imprenta**

Una prueba de imprenta será enviada al autor encargado de la correspondencia, para su lectura y corrección puntual, y debe ser devuelta al editor dentro del plazo que se especifique. Por otra parte, el editor se reserva el derecho a corregir la prueba de imprenta cuidadosamente, pero sin asumir responsabilidad de tal, y de esta manera agilizar el proceso de publicación.

La decisión final para la publicación del trabajo será en el momento en que el Comité Editor acepte las correcciones, que a sugerencia de los árbitros han realizado los autores. Modificaciones a las pruebas de imprenta que no sean de errores menores no serán aceptadas. Ni los editores ni la imprenta aceptarán responsabilidad por la impresión de errores de los artículos que los autores no hayan corregido en la prueba de imprenta.

### **Envío de los manuscritos**

#### **Los artículos deben ser enviados al Editor e incluir:**

- Tres ejemplares impresos en papel, incluyendo los cuadros, figuras y fotografías.
- Una versión electrónica del texto, cuadros (preferentemente en formato MS Word) y figuras (de preferencia en formato Excel), deben adjuntarse en un disco de 3,5" o CD, debidamente rotulado con el apellido del primer autor y las primeras palabras del título del artículo.
- Los trabajos deben ser originales y, por lo tanto, no deben estar en proceso de arbitraje en otra revista.
- Los artículos que se presenten sin considerar las normas de estilo serán devueltos sin ser sometidos a revisión.

- Para experimentos con animales o humanos, el Comité Editor podrá solicitar que se adjunte la autorización de un Comité de Bioética o instancia similar.

- Incluir y completar una declaración de la responsabilidad de autoría, con la firma de todos los autores.

- Se deberá incluir una carta dirigida al Editor solicitando la publicación de su trabajo y señalando a uno de los autores como responsable de la revisión de las pruebas de imprenta y de la correspondencia.

- La propiedad intelectual de los trabajos publicados pertenece a los autores.

- Los revisores de Archivos de Medicina Veterinaria asesoran al Comité Editor para decidir si el trabajo puede ser publicado. Los autores podrán sugerir revisores. Todos los artículos enviados para publicación serán enviados a dos revisores seleccionados por el Comité Editor y pueden incluir, o no, los sugeridos por los autores. En caso de existir controversia en los informes, se recurrirá a un tercero en carácter de árbitroarbitrador, que asesorará al Comité Editor para decidir el destino del trabajo. Los revisores están obligados a mantener el carácter confidencial de toda la información de los trabajos, aun cuando no sean publicados.

- Previo a la publicación de un trabajo aceptado se debe pagar un valor cuyo monto se señala en la Web [www.veterinaria.uach.cl](http://www.veterinaria.uach.cl).

# ***DISCUSSÃO GERAL***

### **3. DISCUSSÃO GERAL**

Os resultados do inquérito sorológico mostram a presença dos vírus BPI-3 e BRSV em ovinos da região de Botucatu-SP. Os anticorpos detectados sugerem que os animais foram expostos à infecção natural por esses agentes sendo, portanto, uma evidência da circulação desses vírus em ovinos dessas propriedades.

Provavelmente o BPI-3 e o BRSV foram introduzidos nesses rebanhos de ovinos, através de contato desses animais com bovinos infectados, o que faz do contato entre essas espécies uma importante fonte de infecção. A literatura alude a possibilidade da infecção em cordeiros inoculados experimentalmente com BRSV, apresentando títulos que variaram de 16 a 256 (AL DARRAJI et al., 1982).

Os achados clínicos de tosse, dispnéia, espirros e corrimento nasal, que foram determinantes na escolha dos animais para os estudos, são condizentes com a literatura que refere os mesmos sinais em ovinos inoculados experimentalmente com RSV da linhagem bovina (AL DARRAJI et al., 1982b, BRYSON et al., 1988), sendo que esta infecção cruzada pode ser mais branda na espécie ovina, sem a detecção clínica de sinais de pneumonia ocasionando

apenas respostas inflamatórias multifocais em região intra alveolar (EVERMANN 1985), fato detectado em nosso estudo pelo número de animais com sorologia evidente, no entanto com sintomatologia branda, sendo estes animais considerados normais pelos produtores.

A distribuição de celularidade nos grupos de ovinos seguiu o esperado quando comparado à celularidade do lavado traqueobrônquico em ovinos sadios e com envolvimento de vias aéreas posteriores, mostrando o efeito biológico de descamação celular (MARCONDES, 2007), no entanto não houve diferença entre a celularidade de vias aéreas anteriores e posteriores. O escovado traqueobrônquico, por outro lado, tem sido mais associado à utilização broncoscópica para diagnóstico direcionado de lesões neoplásicas.

A elevada ocorrência do vírus BPI-3 (159/193, 82,3%) e do BRSV (114/194, 58.8%) nas propriedades estudadas sugere que sejam agentes virais responsáveis por problemas respiratórios nestes rebanhos, já que existe a presença dos vírus BPI3 e BRSV em ovinos da região de Botucatu-SP (GONÇALVES et al, 2009). Os anticorpos detectados sugerem que os animais foram expostos à infecção natural por esses agentes sendo, portanto, uma evidência da circulação desses vírus nos ovinos da região de Botucatu-SP. Uma vez que não existem vacinas comerciais contra esses vírus para espécie ovina disponíveis no mercado e os animais desse estudo não foram imunizados com vacinas específicas para bovinos, os anticorpos detectados indicam que eles foram expostos aos vírus, por infecção natural, uma evidência da atividade viral na área.

Com base nos resultados desse estudo, a presença dos vírus BPI3 e BRSV em ovinos da região de Botucatu-SP estão confirmadas. Apesar de não ser possível estabelecer a verdadeira procedência das infecções virais nesses rebanhos, é provável que o contato eventual dos animais deste estudo com bovinos favoreceu a infecção dos animais e manutenção dos vírus nesses rebanhos. Vale ressaltar ainda que grande parte dos animais que compõem os rebanhos do Centro-Oeste Paulista é proveniente de propriedades da Região Sul do país, principalmente do Rio Grande do Sul, onde a prática de criações mistas de bovinos e ovinos é bastante comum e, casos de infecções naturais de BRSV e BPI-3, já foram relatados neste estado (DRIEMEIER, et al., 1997; GONÇALVES et al., 2003)

Os aspectos histopatológicos descritos neste estudo também se encontram de acordo com o referido na literatura (AL DARRAJI et al., 1982; EVERMANN et al., 1985; BRYSON et al., 1988a) quando há infecções pelos vírus estudados, com infiltrado de células mononucleares e PMN, espessamento do septo alveolar com hiperplasia do BALT e áreas de atelectasia. Num dos animais deste trabalho (número 14), cujo diagnóstico histomorfológico foi de broncopneumonia supurativa, foi detectado além das alterações mencionadas, a presença de exsudato supurativo com fibrina, hiperplasia de células epiteliais e bronquiolares com duas camadas e presença de inclusões eosinofílicas, corroborando com AL Darraji et al., (1982) quando associa o BRSV e a inoculação de *P. haemolytica*. Este fato sugere neste animal, a associação de agentes etiológicos e o agravamento das lesões, quando estão presentes agentes virais e bacterianos (AL DARRAJI et al., 1982a; BRYSON et al., 1983; CASTLEMAN et al., 1985; SLAUSON et al., 1987; BROWN & ANANABA, 1988; SLOCOMBE et al., 1990).

A broncopneumonia intersticial causada por estes agentes virais é histologicamente caracterizada por bronquite e bronquiolite necróticas, com a presença de exsudato neutrofilico, proliferação do septo alveolar e presença de células gigantes com inclusões citoplasmáticas eosinofílicas (DUNGWORTH 1993). Tais lesões são semelhantes às encontradas nos animais estudados, porém, somente um animal apresentou inclusão intracitoplasmática e células gigantes. A ausência das inclusões e células gigantes pode estar ligada ao fato dos animais terem sobrevivido à fase aguda da infecção viral, da mesma forma que em infecções experimentais, as inclusões citoplasmáticas não foram encontradas e, somente ocasionalmente, detectou-se presença de células multinucleadas (AL-DARRAJI et al., 1982).

O tipo de pneumonia predominante foi a pneumonia intersticial em 17/40 casos, concordando com os estudos em pulmões de cabra onde a pneumonia experimental ocasionada por BRSV eram de caráter intersticial, multifocal, com infiltrado nos septos alveolares de mono e polimorfonucleares, com bronquite e bronquiolite moderadas, com acúmulo de macrófagos, linfócitos e PMN (AL-DARRAJI et al., 1982; YENER et al., 2005).

Em relação ao diagnóstico direto da participação viral nas 80 amostras testadas (40 de via aérea anterior e 40 de via aérea posterior), todas foram negativas para o isolamento em cultivo celular, dos dois vírus respiratórios pesquisados.

Muitos vírus têm sido associados a casos de doença respiratória em ovinos (ALLEY 1975; LEHMKUHL & CUTLIP, 1982; PUGH, 2005). Co-infecções de dois ou mais vírus são comuns e já foram demonstradas por vários autores (CABELLO et al., 2006; YEŞILBAĞ & GÜNGÖR, 2009). Em casos de doença respiratória, em especial de pneumonias agudas, a atividade viral é normalmente observada nos estágios iniciais da doença. Em muitos casos a infecção viral primária dá início à doença, produzindo danos ao trato respiratório que são subsequente estendidos por micoplasmas e infecções bacterianas secundárias (BRYSON, 1985).

É impossível afirmar que há participação viral em todos os casos de enfermidades respiratórias. Contudo, não há dúvidas que em muitos casos de doenças das vias aéreas, a participação viral não foi confirmada devido ao momento impróprio da coleta (quando já não havia mais a participação de vírus, apenas de bactérias) ou pela submissão de material inadequado ou insuficiente para um diagnóstico laboratorial apropriado (BRYSON, 1985).

Como não foi possível fazer o isolamento em cultivo celular e identificação dos vírus BPI-3 e BRSV em nenhuma das amostras obtidas do trato respiratório anterior e posterior dos animais deste estudo e houve marcação de células por imunoistoquímica é admissível, que a colheita tenha sido realizada em um estágio da doença em que não havia mais presença de vírus ativo causando danos ao trato respiratório, ou mesmo que o material colhido não tenha sido em quantidade suficiente ou foi inadequado para fazer o diagnóstico. Em métodos moleculares como a RT-PCR, a seleção do material biológico a ser utilizado para o diagnóstico, forma de conservação e tempo de estocagem são extremamente importantes, principalmente em se tratando de vírus como o BPI-3 e o BSRV, cujo genoma é constituído por RNA de fita simples (HENRICKSON , 1994; MURPHY et al., 1995) que pode facilmente sofrer degradação (GEBARA et al., 2004).

A literatura descreve dificuldades em relação ao isolamento viral devido à baixa viabilidade dos vírus em condições ambientais e o manejo e conservação das amostras nos casos de campo. As técnicas imunológicas para a detecção de antígenos virais, como a imunofluorescência e a imunoistoquímica são consideradas ferramentas importantes para o estudo da patogênese de enfermidades respiratórias (BRYSON et al., 1988; FLORES et al., 2000,). Mais eficaz ainda é a associação de técnicas diferentes. Desta maneira, neste estudo constatou-se a circulação viral na região de Botucatu pela sorologia e identificaram-se antígenos virais pela técnica de IHC.

Em infecção experimental com o BRSV em bezerros foi constatada a presença de antígenos virais em animais eutanasiados entre quatro e dez dias após a inoculação, não sendo detectadas células positivas à imunoistoquímica nos dias 1, 2 e 13 pós inoculação (BRYSON et al., 1988). Como os animais deste estudo foram escolhidos na ocasião do abate, por apresentar problema respiratório, sem prévio conhecimento da evolução da sintomatologia apresentada pode-se explicar a dificuldade tanto no isolamento dos vírus quanto da detecção de antígenos nas amostras colhidas. Dos trinta casos de diagnóstico histopatológico de pneumonia, apenas 10 (33%) foram positivas na IHC, sendo 4 (13,3%) e 6 (20%) para o BPI-3 e BRSV, respectivamente. A frequência de positivos na IHC dentro dos animais com algum tipo de pneumonia intersticial foi abaixo da encontrada em caprinos abatidos e estudados para a frequência de infecção por PI-3 (28/42, 66,6%) (YENER, et al., 2005). Tal autor, em estudo anterior, refere a associação de agentes bacterianos com os casos positivos para BPI-3, sendo mais frequentemente isolados a *P. haemolytica* (43,7%), *Mycoplasma* spp. (25%) e *S. aureus* (18,7%). Isto pode ter ocorrido nos animais onde destacou-se a presença de pneumonia fibrinosa (6,7 %), BCP supurativa (3,3 %) e pneumonia abscedativa crônica (6,7%) e nos casos de pneumonia intersticial moderada e grave com 16,7% e 10% dos animais deste estudo, respectivamente.

Foi notada neste estudo uma incidência de animais considerados sadios, no entanto, apresentando sintomatologia clínica de doença respiratória no momento do abate. Com os achados sorológicos, associados à detecção de antígenos pela IHC há indícios da participação viral atribuídos aos casos de doenças respiratórias em ovinos, cuja participação e/ou sinergismo com

agentes bacterianos possa ocasionar um agravamento dos processos pneumônicos com mortalidade nos rebanhos. Destacada a importância dos vírus circulantes, e das técnicas que permitem, com facilidade, a identificação dos agentes etiológicos, fazem-se necessárias mais pesquisas e a implantação de técnicas na rotina laboratorial de diagnóstico para realização de um diagnóstico etiológico preciso e confiável para a tomada de medidas preventivas.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

#### **4. CONCLUSÕES GERAIS**

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- Há a presença dos vírus BPI-3 e BRSV na população ovina;
- Não houve diferença na distribuição da celularidade entre vias aéreas anteriores e posteriores;
- Não houve isolamento de vírus das vias aéreas anteriores e posteriores;
- A imunoistoquímica detectou a presença de antígenos virais, embora o isolamento não tenha detectado a presença de vírus viáveis nas amostras estudadas;
- A pneumonia intersticial é freqüente na espécie ovina e passa despercebida, podendo ocasionar sérios prejuízos para a ovinocultura;
- Há evidências da interação entre agente virais e bacterianos ocasionando enfermidade respiratória na espécie ovina

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; PAULO M ROEHE, P. M.; ARNS, C.W. Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction in experimentally infected calves. **Vet. Microbiol.**, v.105, n.205, p. 131-135, 2005.

AL-DARRAJI, A.M.; CULTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; GRAHAM, D.L. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: Pathologic studies. **Am. J. Vet. Res.** v.42, n.2, p.224-229, 1982.

AL-DARRAJI, A.M.; CULTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: immunofluorescent and electron microscopic studies. **Am. J. Vet. Res.** v.42, n.2, p.230-235, 1982a.

AL-DARRAJI, A.M.; CULTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; GRAHAM, D.L.; KLUGE, J.P.; FRANK, G.H. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: Clinical and microbiologic studies **Am. J. Vet. Res.** v.42, n.2, p.236-240, 1982b.

AL-SULTAN, I.I.; AL-SADI, H.I.; YOUNKANA, S. O.; Pneumonia in Sheep and Goats in Iraq: A Pathological study. **Indian J. Anim. Sciences**, v.58, n.9, p.1007-1010, 1988.

ALLEY, M.R. The bacterial flora of the respiratory tract of normal and pneumonic sheep. **N. Z. Vet. J.** v.23, p. 113-118, 1975.

ALKAN F, OZKUL A, BILGE-DAGALP S, YESILBAG K, OGUZOGLU TC, AKÇA Y, BURGU I. Virological and serological studies on the role of PI-3 virus, BRSV, BVDV and BHV-1 on respiratory infections of cattle. I. The detection of

---

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996.468p.

etiological agents by direct immunofluorescence technique. **Dtsch Tierarztl Wochenschr.** v.107, n.5, p.193-195, 2000.

ARAÚJO, S.A.C.; DANTAS, T.V.M.; SILVA J.B.A.; RIBEIRO, A.L.; RICARTE, A.R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Identificação do maedi-visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. **Arq. Inst. Biol.** v.71, n.4, p.431-436, 2004.

BEECH, J. Technique of traqueobronchial aspiration in horse. **Equine Vet. Journal**, v.13, n.2, p.136 –137, 1981.

BELKNAP, E. B. Enfermidades do sistema respiratório. In: PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 119-43, 2005.

BRODERSEN, B.W.; KELLING, C.L. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. **Am J Vet Res.** v.59, n.11, p.1423-1430, 1998.

BROGDEN, K. A.; LEHMKUHL, H. D.; CUTLIP, R.C. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. **Vet. Res.**, Paris, v. 29, p. 233-254, 1998a.

BROWN, T.T., ANANABA, G. Effect of respiratory infections caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, p.1447-51, 1988.

BRYSON, D.G.; McNULTY, M.S.; McCRACKEN, R.M.; CUSH, P.F. Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. **J. Comp. Pathol.**, v.93, p.397-414, 1983.

BRYSON, D.G. Calf pneumonia. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.1, p. 237-57, 1985.

BRYSON, D.G.; CUSH, P.F.; McNULTY, M.S.; PLATTEN, M.; ALLAN, G.M. An immunoperoxidase method of detecting respiratory syncytial virus antigen in paraffin of pneumonic bovine lung. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, n. 7, p.1121-26, 1988a.

BRYSON, D.G.; EVERMANN, J.F.; DENNY LIGGITT, H; FOREYT, W.J. BREEZE, R.G. Studies on the pathogenesis and interspecies transmission of respiratory syncytial virus isolated from sheep. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, n. 8, p.1424-1430, 1988.

BURKHARD, M.; VALENCIANO, A.; BARGER, A. Sistema respiratório. In; RASKIM, R.E.; MEYER, D.J. Atlas de citologia de cães e gatos. Roca:São Paulo, 2003, p. 113-156.

BURRELLS, C., WILLIAMS J.T. Bronchoalveolar lavage of the live anaesthetised sheep. **Res Vet Sci.** v.42. n.1, p.109-112, jan. 1987.

CABELLO K.R., QUISPE R.C.H., RIVERA H.G. Frecuencia de los virus parainfluenza-3, respiratório sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco. **Rev. Investig. Vet. Peru** v.17, p.167-172, 2006.

CANDEIAS, J.A.N.; RIBEIRO, L.C. Anticorpos inibidores da hemaglutinação para as cepas SF-4 e HA-1 de Myxovirus parainfluenza-3, em gado bovino do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.37, p. 129-35, 1970.

CARLTON, W.W.; McGAVIN, M. *Patologia veterinária especial*. 2.ed. Porto Alegre; ArtMed. 1998. 672p.

CASTLEMAN, W.L., LAY, J.C., DUBOVI, E.J., SLAUSON, D.O. Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.547-54, 1985.

CODE OF FEDERAL REGULATION. Title 9. Animals and animal products. 2005. Chapter 1. Animal and plant health inspection service, USDA. Part 113.216. Disponível em: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_05/9cfr113\\_05.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_05/9cfr113_05.html). Acesso em 08 mai 2005.

DAL PIZZOL M, RAVAZZOLO A P, FERNANDES J C T, MOOJEN V. Detecção de anticorpos para o vírus Parainfluenza-3 em bovinos e ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. **Arq. Fac.Vet. UFRGS**, 17, 59-64, 1989.

DEBEY, B. M.; LEHMKUHL, H. D.; CHARD-BERGSTROM, C.; HOBBS, L. A. Ovine Adenovirus Serotype 7-associated Mortality in Lambs in the United States. **Vet. Pathol.** v.38, p.644–648, 2001.

DOMINGUEZ H.G. *Virus respiratorio sincicial bovino: padronização e comparação de técnicas sorológicas*. 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia. Campinas, SP.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M.J.P.; MOOJEN, V.; ARNS, C.W.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U.M. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v.17, n.2, p.77-81, 1997.

DUNBAR, M.R.; WARD, A.C.S.; POWER, G. Isolation of *Pasteurella haemolytica* from Tonsillar biopsies of Rocky Mountain Bighorn Sheep. **Journal of Wildlife Diseases**, v.26, n.2, p.210-213, 1990.

DUNGWORTH, D. L., Respiratory system. In: Jubb K. V. F.; Kennedy P. C.; Palmer N., *Pathology of Domestic Animals*, 4 ed, Academic Press, Inc., San Diego, CA. p. 613–615, 1993.

EASTON A.J.; DOMACHOWSKE J.B.; ROSENBERG H.F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.17, n.2, p.390-412, 2004

EVERMANN, J. F.; LIGGITT, H.D.; PARISH, S.M.; WARD, A.C.S.; LEAMASTER, B.R. Properties of a respiratory syncytial virus isolated from sheep with rhinitis. **Am. J. Vet. Res.** v. 46, n. 4, p. 947-951, 1985.

FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arq. Bras. Med. Vet.** v. 52, n. 6, 2000.

FIGUEIREDO, J. B. Pasteureloses (*Pasteurellosis*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 21, n. 3, p. 40-48, 1997.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; MEDEIROS, M.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; DRIEMEIER, D.; SCHUCH, L.F.; MORAES, M. A retrospective search for

bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Pesq. Vet. Bras.** v.20, n.4, p.139-143, 2000.

FORMAN, A.J., BABIUK, L.A., BALDWIN, F., FRIEND, S.C.E. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage. **Am. J. Vet. Res.**, v.43, p.1174-9, 1982.

GEBARA, C.M.S. WOSIACKI, R.S.; NEGRÃO, F.J.; OLIVEIRA, B.D.; BELONI, S.N.E.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, 2004.

GILMOUR, N. J. L.; ANGUS, K. W.; GILMOUR, J. S. Pasteurellosis In. MARTIN, W. B.; AITKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 2ed 1991. p.133-139.

GILMOUR, N.J.L.; GILMOUR, J.S. Diagnosis of Pasteurellosis in Sheep. In: BODEN, E. **Sheep and Goat Practice**. 1991a. p.122-32.

GONÇALVES; D.A., SPILKI, R.V., CHIMINAZZO, C.; OLIVEIRA M.A.; FRANCO A.C.; ROEHE, P.M. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.953-956, 2003.

GONÇALVES, R.C. **Estudo Clínico e citológico em Bezerros clinicamente Sadios e Portadores de Broncopneumonia Moderada e Grave. - O lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico.** 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista -Botucatu.

GONÇALVES, R.C., MATTOS, M.C.F.I., KUCHEMBUCK, M.R.G. *et al.* Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p.307-311, jun. 2004.

GONÇALVES, R.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, D.O.L; MARCONDES, J.S.; PITUCO, E.M.; DIAS, A. Ocorrência do vírus parainfluenza-3, vírus respiratório sincicial, vírus da diarreia viral bovina e herpesvírus tipo 1 em rebanhos ovinos da região de Botucatu-SP. **Ciência Animal Brasileira** – Supl. 1, – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.



KNOWLES Jr., D. P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practices**. v. 13, p. 1-11, 1997.

LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R.C. Experimentally respiratory syncytial viral fection in lambs. **Am. J. Vet. Res.** v.40, n.4, p.512-514, 1979.

LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R.C. Characterization of parainfluenza type 3 virus isolated from the lung of a lamb with pneumonia. **Am. J. Vet. Res.** v.43, n. 4, p.626-628, 1982.

LEHMKUHL, H. D., CUTLIP, R.C; BOLIN, S.R.; BROGDEN, K.A. Seroepidemiologic survey for antibodies to select viruses in the respiratpry tract of lambs. **Am. J. Vet. Res.** v.46, n.12, p. 2601-2604, 1985.

LOKENS GARD, B.E.; GOYAL, S.M.; KRUEGER, D.A. Comparison of three immunoassays for the rapid detection of bovine respiratory syncytial virus. **Microbiologica**. v.15, n.3, p.259-64, 1992.

LYON, M.; LEROUX, C.; GREENLAND, T.; CHASTANG, J.; PATET, J.; MORNEX, J. F Presence of a unique parainfluenza vírus 3 strain identified by RT-PCR in visna-maedi vírus infected sheep. **Vet. Microbiol.**, v.51, p.95-104 1997.

MARCONDES, J. S. **Estudo clínico-citológico em ovinos sadios e portadores de afecções respiratórias de ocorrência natural, utilizando-se o lavado traqueobrônquico como auxílio diagnóstico.** 2007. 107f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARKHAN, R.J.F., WILKIE, B.N. Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages: cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, p.18-22, 1980.

MARTIN, W.B.; AITKEN, I.D. **Diseases of sheep.** 2.ed. London: Blockewell Scientific Publications, 1991, 418p.

MARTIN,W.B. Respiratory Infeccions of sheep. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**19:3, p.171-179, 1996.

MEYER D.J. Obtenção de manuseio das amostras para exame Citológico. In: RASKIN R.E. & MEYER D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003, p.01-14.

MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, v.1, p.497, 1995.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. *Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals* . 5 th Ed., 2004. Paris: **OIE**. Disponível em <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00056.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00056.htm)> Acesso em: 30 set. 2006.

OLIVIER, A.; GALLUP, J.; MACEDO, M.M.; VARGA, S.M.; ACKERMANN, M. Human respiratory syncytial virus A2 strain replicates and induces innate immune responses by respiratory epithelia of neonatal lambs. **Int J Exp Pathol**. v.90, n.4, p.431-438, 2009.

PEIXOTO P.V.; MOTA R.A.; BRITO M.F.; CORBELLINI L.G. DRIEMEIER D.; SOUZA M.I. Infecção natural pelo Vírus Sincicial respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesq. Vet. Bras**. V.20, n.4, p. 171-175, 2000.

POMMER, J.; SCHAMBER, G. Isolation of adenovirus from lambs with upper respiratory syndrome. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 3, p. 204-210, 1991.

PUGH, D. G. Clínica de Ovinos e Caprinos. São Paulo: Roca, 2005 p. 513.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. London: W. B. Saunders, 2002. 1873p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. (10nd ed.). Saunders Elsevier, Saint Louis, USA, 2007. 2156p.

REEDY, J.R.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v.27, n.3, 1938.

RHODES M. B., KLUCAS, C. A.; FREY, M. L., ANDERSON G. A. A blocking ELISA for the detection of specific antibodies to bovine respiratory syncytial virus. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.1, p. 324-328, 1989.

RICHARDS, A.B., RENSCHAW, H.W. Functional and metabolic activity of bovine pulmonary lavage cells phagocytically stimulated with pathogenic isolates of *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, p.329-34, 1989.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p.329-335, 1947.

SAMAL, S.K.; PASTHEY, M.K.; MCPHILLIPS, T.H.; CARMEL, D.K.; MOHANTY, S.B. Reliable Confirmation of Antibodies to Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using BRSV Nucleocapsid Protein Expressed in Insect Cells. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.12, p.3147-3152, 1993.

SCOTT, P.R. Field study of undifferentiated respiratory disease in housed beef calves. **Vet. Rec.**, v.134, p.325-7, 1994.

SCHREIBER, P.; MATHEISE, J.P.; DESSY, F.; HEIMANN, M.; LETESSON, J.J.; COPPE, P.; COLLARD, A. High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**. v.47, n.7, p.535-550, 2000.

SCHRIJVER, R.S.; DAUS, F.; KRAMPS, J.A.; LANGEDIJK, J.P.; BUIJS, R.; MIDDEL, W.G.; TAYLOR, G.; FURZE, J.; HUYBEN, M.W.; VAN OIRSCHOT, J.T. Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. **Vet Microbiol.** v.53, p.253-60, 1996.

SHARMA, R.; WOLDEHEIWET, A. Increased susceptibility to *Pasteurella haemolytica* in lambs experimentally infected with Bovine Respiratory Syncytial virus. **J. Comp. Path.** v.103, p.411-420, 1990.

SLAUSON, D.O., LAY, J.C., CASTLEMAN, W.L., NEILSEN, N.R. Alveolar macrophage phagocytic kinetics following pulmonary parainfluenza-3 virus infection. **J. Leucocyte Biol.**, v.41, p.412-20, 1987.

SLOCOMBE, R., MULKS, M., KILLINGSWORTH, C.R., DERKSEN, F.J., ROBINSON, N.E. Effect of *Pasteurella haemolytica* — derived endotoxin on pulmonary structure and function in calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, p.433-8, 1990.

SOLOMON, D.A.; SOLLIDAY, N.H.; GRACEY, D.R. Cytology in fiberoptic bronchoscopy Comparison of bronchial brushing, washing and post-bronchoscopy sputum. **Chest**. v. 65, p.616-619, 1974.

SORDEN, S.D.; KERR, R.W.; JANZEN, E.D. Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection. **J Vet Diagn Invest**. p.12, n.6 p.562-565, 2000.

STEVENSON, R. B. & D. E. HORE Comparative pathology of lambs and calves infected with parainfluenza virus type 3. **J. Comp. Path.** v.80, p. 613-618, 1970.

STÖBER, M. Aparelho Respiratório.In. ROSENBERGER\_**Exame Clínico dos Bovinos**\_3º ed, 1993. p.139-165.

SWEENEY, C.R.; SMITH, J.A. Moléstias do Sistema Respiratório. In.SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**, Vol.1, 1993. p.501-517.

SWENSON, P. D.; KAPLAN, M. H. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by a commercial enzyme immunoassay. **J. Clin. Microbiol.** v.23, n. 3, p.485-488, 1986.

VAINIONPÄÄ, R.; HYYPIÄ T. Biology of Parainfluenza Viruses. **Clin. Microbiol. Rev.** v.7, n.2, p. 265-275, 1994.

VIANA L. **Pesquisa de *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* e *Pasteurella multocida* em ovinos clinicamente sadios e portadores de afecções respiratórias na região de Botucatu–SP.** 2003. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VIANA, L.; GONÇALVES, R.C.; OLIVEIRA FILHO J.P.; PAES, A.C.; AMORIM R.M. Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em ovinos sadios e com enfermidade respiratória. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.6, p.1579-1582, 2007.

VILCEK, S.; M ELVANDER, M.; PORDANY, A. B.; BELAK, S. Development of Nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2225-223, 1994.

WALKER, R.D., HOPKINS, F.M., SCHULTZ, T.W., McCRACKEN, M.D. Changes in leukocytes populations in pulmonary lavage fluids after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.2429-33, 1985.

WILLOUGHBY, R., ECKER, G., McKEE, S., RIDDOLLS, L., VERNAILLEN, C., DUBOVI, E., LEIN, D., MAHONY, J.B., CHERNESKY, M., NAGY, E., STAEMPFLI, H. The effects of Equine Rhinovirus, Influenza Virus and Herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, p.115-21, 1992.

WHITWELL, K.E.; GREET, T.R.C. Collection and evolution of tracheobronchial washes in the horse. **Equine Veterinary Journal**, 16:6, p.499-508. 1984.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis.** 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall,, 1984. 450p.

ZINKL J. G. Lowe Respiratory Tract. In. COWELL R. L.; TYLER R. D. **Diagnostic Cytology and Hematology of the horse.** Missouri: Mosby. 2 ed. 2002 p. 73-86.

YENER, Z.; SAGLAM Y. S.; TIMURKAAN, N.; ILHAN, F. Immunohistochemical Detection of Parainfluenza Type 3 Virus Antigens in Paraffin Sections of Pneumonic Caprine Lungs. **J. Vet. Med. A.** v.52, p.268–271, 2005.

YENER, Z., GÜRTÜRK, K.; GÜLBAHAR M. Y.; SOLMAZ, H. Pathological and bacteriological studies on pneumonia in goats slaughtered at Bitlis slaughterhouse. **Vet. Bil. Derg.** v.17, p.13–20. 2005.

YENER, Z.; ILHAN, F.; ILHAN, Z.; SAGLAM, Y. S. Immunohistochemical detection of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* antigens in goats with natural pneumonia. **Vet Res Commun.** v. 33, p. 305–313, 2009.

YEŞİLBAĞ, K.; GÜNGÖR, B. Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in North-Western Turkey. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.41, p.421–425, 2009.

***ANEXOS***

## ANEXOS

### Anexo 01. Tabelas e quadros

**Tabela 1.** Escore de celularidade da citologia das vias aéreas de ovinos sadios (n=10).

| Número<br>do<br>Animal | ESCORE DAS CÉLULAS DAS VIAS AÉREAS |             |            |            |             |                       |             |            |            |             | Mediana |
|------------------------|------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-----------------------|-------------|------------|------------|-------------|---------|
|                        | ANTERIOR                           |             |            |            |             | POSTERIOR             |             |            |            |             |         |
|                        | Células<br>Epiteliais              | Neutrófilos | Macrófagos | Linfócitos | Eosinófilos | Células<br>Epiteliais | Neutrófilos | Macrófagos | Linfócitos | Eosinófilos |         |
| 3                      | 2                                  | 4           | 3          | 3          | 0           | 4                     | 0           | 4          | 0          | 0           | 3       |
| 7                      | 2                                  | 2           | 2          | 1          | 0           | 3                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 2       |
| 8                      | 3                                  | 0           | 2          | 0          | 0           | 3                     | 2           | 2          | 1          | 0           | 2       |
| 9                      | 4                                  | 0           | 2          | 0          | 0           | 2                     | 0           | 3          | 0          | 0           | 0       |
| 10                     | 2                                  | 1           | 2          | 0          | 0           | 3                     | 1           | 2          | 0          | 0           | 1       |
| 11                     | 2                                  | 0           | 2          | 0          | 1           | 3                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 1       |
| 16                     | 3                                  | 0           | 3          | 1          | 0           | 2                     | 0           | 3          | 0          | 0           | 1       |
| 17                     | 3                                  | 0           | 3          | 0          | 1           | 3                     | 2           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 18                     | 3                                  | 4           | 2          | 1          | 0           | 1                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 1       |
| 30                     | 2                                  | 3           | 2          | 0          | 0           | 3                     | 2           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| Mediana                | 3                                  | 1           | 2          | 0          | 0           | 3                     | 0           | 3          | 0          | 0           |         |

Escore 0 – Ausente (quando não foi encontrado o tipo celular pesquisado)

Escore 1 – Raros (quando havia de uma a cinco células por campo)

Escore 2 – Discreto (quando havia de seis a dez células por campo)

Escore 3 – Moderado (quando havia de 11 a 40 células por campo)

Escore 4 – Acentuado (quando havia 41 ou mais células por campo)

**Tabela 2.** Escore de celularidade da citologia das vias aéreas de ovinos portadores de doença respiratória (n=30).

| Número<br>do<br>Animal | ESCORE DAS CÉLULAS DAS VIAS AÉREAS |             |            |            |             |                       |             |            |            |             | Mediana |
|------------------------|------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-----------------------|-------------|------------|------------|-------------|---------|
|                        | ANTERIOR                           |             |            |            |             | POSTERIOR             |             |            |            |             |         |
|                        | Células<br>Epiteliais              | Neutrófilos | Macrófagos | Linfócitos | Eosinófilos | Células<br>Epiteliais | Neutrófilos | Macrófagos | Linfócitos | Eosinófilos |         |
| 1                      | 4                                  | 1           | 4          | 0          | 0           | 2                     | 0           | 3          | 0          | 0           | 1       |
| 2                      | 4                                  | 2           | 4          | 1          | 0           | 4                     | 0           | 4          | 0          | 0           | 2       |
| 4                      | 4                                  | 0           | 3          | 0          | 0           | 3                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 0       |
| 5                      | 3                                  | 1           | 3          | 0          | 0           | 3                     | 2           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 6                      | 2                                  | 4           | 2          | 1          | 0           | 4                     | 2           | 2          | 1          | 0           | 2       |
| 12                     | 1                                  | 4           | 2          | 1          | 0           | 2                     | 1           | 2          | 0          | 0           | 1       |
| 13                     | 3                                  | 2           | 3          | 0          | 0           | 3                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 2       |
| 14                     | 4                                  | 1           | 3          | 1          | 0           | 2                     | 4           | 2          | 1          | 0           | 2       |
| 15                     | 3                                  | 2           | 3          | 0          | 0           | 2                     | 1           | 2          | 0          | 0           | 2       |
| 19                     | 3                                  | 1           | 3          | 1          | 0           | 2                     | 1           | 3          | 2          | 0           | 2       |
| 20                     | 3                                  | 0           | 2          | 0          | 0           | 1                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 0       |
| 21                     | 3                                  | 0           | 2          | 0          | 0           | 4                     | 0           | 3          | 0          | 0           | 0       |
| 22                     | 3                                  | 0           | 4          | 0          | 0           | 3                     | 0           | 3          | 0          | 0           | 0       |
| 23                     | 4                                  | 0           | 3          | 0          | 0           | 3                     | 0           | 2          | 0          | 0           | 0       |
| 24                     | 3                                  | 0           | 2          | 0          | 0           | 2                     | 1           | 3          | 0          | 0           | 1       |
| 25                     | 3                                  | 2           | 3          | 1          | 0           | 2                     | 2           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 26                     | 3                                  | 3           | 2          | 0          | 0           | 1                     | 4           | 3          | 1          | 0           | 2       |
| 27                     | 3                                  | 1           | 3          | 0          | 0           | 3                     | 1           | 3          | 0          | 0           | 1       |
| 28                     | 2                                  | 4           | 3          | 0          | 0           | 2                     | 1           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 29                     | 1                                  | 4           | 3          | 3          | 0           | 3                     | 1           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 31                     | 2                                  | 3           | 2          | 1          | 0           | 2                     | 3           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 32                     | 2                                  | 3           | 2          | 2          | 0           | 2                     | 2           | 3          | 1          | 0           | 2       |
| 33                     | 2                                  | 4           | 2          | 3          | 0           | 1                     | 2           | 3          | 1          | 0           | 2       |
| 34                     | 3                                  | 1           | 3          | 0          | 0           | 2                     | 2           | 3          | 1          | 0           | 2       |
| 35                     | 2                                  | 0           | 2          | 1          | 0           | 2                     | 2           | 3          | 1          | 0           | 2       |
| 36                     | 3                                  | 0           | 2          | 0          | 0           | 2                     | 0           | 3          | 0          | 0           | 0       |
| 37                     | 2                                  | 3           | 2          | 0          | 0           | 3                     | 2           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 38                     | 2                                  | 4           | 2          | 2          | 0           | 3                     | 1           | 3          | 1          | 0           | 2       |
| 39                     | 3                                  | 1           | 2          | 0          | 0           | 2                     | 2           | 3          | 0          | 0           | 2       |
| 40                     | 3                                  | 3           | 2          | 2          | 0           | 2                     | 2           | 3          | 2          | 0           | 2       |
| Mediana                | 3                                  | 2           | 3          | 0          | 0           | 2                     | 1           | 3          | 0          | 0           |         |

Escore 0 – Ausente (quando não foi encontrado o tipo celular pesquisado)

Escore 1 – Raros (quando havia de uma a cinco células por campo)

Escore 2 – Discreto (quando havia de seis a dez células por campo)

Escore 3 – Moderado (quando havia de 11 a 40 células por campo)

Escore 4 – Acentuado (quando havia 41 ou mais células por campo)

**Tabela 03.** Procedimentos utilizados durante a etapa de padronização da técnica de imunistoquímica para os vírus BPI-3 e BRSV.

| Nº   | Ac Primário* | Diluição | Bloqueio peroxidase                                                                                               | Recuperação antigênica                                    | Incubação       | AC Secundário | Tempo DAB |
|------|--------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------|
| 01   | BPI-3        | 1:400    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +<br>Metanol +<br>Molico® 8%                                                        | Citrato pH6,0 na Panela Pascal por XX minutos             | Overnight a 4°C | ABC (1:100)   | 5'        |
| 02   | BPI-3        | 1:800    |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 03   | BPI-3        | Ig Goat  |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 04   | BRSV         | 1:500    |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 05   | BRSV         | 1:100    |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 06   | BRSV         | Ig Goat  |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 07   | BPI-3        | 1:3.200  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +<br>Metanol +<br>Molico® 8%                                                        | Citrato 10mM, pH 6,0 3x3 minutos em microondas (700Watts) | 2h a 4°C        | ABC (1:100)   | 5'        |
| 08   | BPI-3        | 1:3.600  |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 09   | BRSV         | 1:50.000 |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 10   | BRSV         | 1:60.000 |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 11   | BPI-3        | 1:3.200  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +<br>Metanol +<br>Molico® 8% +<br>Bloqueio Avidina e Biotina – Soro Normal de Cabra | Citrato 10mM, pH 6,0 5min microondas                      | Overnight a 4°C | ABC (1:100)   | 3'        |
| 12   | BPI-3        | 1:3.600  |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 13   | BRSV         | 1:50.000 |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 14   | BRSV         | 1:60.000 |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 15** | BPI-3        | 1:3.200  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +<br>Metanol +<br>Molico® 8%                                                        | Citrato 10mM, pH 6,0 3x3 minutos em microondas (700Watts) | Overnight a 4°C | ABC (1:100)   | 5'        |
| 16   | BPI-3        | 1:3.600  |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 17** | BRSV         | 1:50.000 |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |
| 18   | BRSV         | 1:60.000 |                                                                                                                   |                                                           |                 |               |           |

\* VMRD, Inc., Pullman, WA, USA, BRSV 210-70 e PI-3210-70

\*\* Protocolo utilizado nas reações da técnica de IHC.

**Quadro 1.** Relação entre achados histopatológicos, diagnóstico histopatológico, sorologia e resultado da imunoistoquímica das amostras pulmonares de ovinos com doença respiratória submetidos ao abate.

| Animal | Achados histopatológicos                                                                                                                                                                                      | Diagnóstico histopatológico         | Sorologia<br>Título* |                   | Imunoistoquímica |      |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------|------------------|------|
|        |                                                                                                                                                                                                               |                                     | BPI-3 <sup>a</sup>   | BRSV <sup>b</sup> | BPI-3            | BRSV |
| 1      | Acentuada congestão, com marginação de leucócitos e ausência do tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) reativo                                                                                          | Fase inicial de pneumonia fibrinosa | NR                   | NR                | -                | -    |
| 2      | Infiltrado perivascular com células mononucleares, espessamento do septo alveolar com PMN na luz, presença de neutrófilos em capilares, áreas de atelectasia, com fibrose, espessamento da pleura             | Pneumonia intersticial discreta     | NR                   | NR                | -                | +    |
| 4      | Colabamento alveolar, hiperplasia do BALT com discreta reatividade e presença de células jovens (grandes)                                                                                                     | Pneumonia intersticial discreta     | NR                   | NR                | -                | -    |
| 5      | Hiperplasia do BALT com infiltrado perivascular de células mononucleares com espessamento do septo alveolar, áreas de atelectasia e hemorragia                                                                | Pneumonia intersticial discreta     | NR                   | NR                | -                | +    |
| 6      | Hiperplasia do BALT, infiltrado perivascular de células mononucleares com espessamento do septo alveolar                                                                                                      | Pneumonia intersticial discreta     | NR                   | NR                | -                | +    |
| 12     | Hiperplasia do BALT, com espessamento do septo alveolar                                                                                                                                                       | Pneumonia intersticial discreta     | NR                   | NR                | -                | +    |
| 13     | Congestão com hemorragia e áreas congestivas edematosas, alguns focos de fibrina no alvéolo, áreas com neutrófilos, fibrina e hemácias ao redor de alvéolos e brônquios. Fase inicial de hepatização vermelha | Pneumonia fibrinosa                 | NR                   | NR                | -                | -    |

| Animal | Achados histopatológicos                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Diagnóstico histopatológico                       | Sorologia Título*  |                   | Imunoistoquímica |      |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|
|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                   | BPI-3 <sup>a</sup> | BRSV <sup>b</sup> | BPI-3            | BRSV |
| 14     | Infiltrado misto mono e PMN, presença de inclusões citoplasmáticas em células epiteliais bronquiolares, presença de exsudato supurativo com fibrina e PMN, hiperplasia do BALT com predomínio de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, exocitose de leucócitos, hiperplasia de células epiteliais e bronquiolares com duas | Broncopneumonia supurativa ou purulenta acentuada | NR                 | NR                | -                | +    |
| 15     | Espessamento do septo alveolar, áreas de atelectasia e hiperplasia de BALT                                                                                                                                                                                                                                                 | Pneumonia intersticial discreta                   | NR                 | NR                | +                | -    |
| 19     | Necrose caseosa com abscessos em diferentes estágios de formação, abscessos crônicos com cápsula de tecido conjuntivo e camadas de células mononucleares, macrófagos com aspecto de células epitelioides.                                                                                                                  | Pneumonia abscedativa crônica                     | 256                | NR                | -                | -    |
| 20     | Pneumonia abscedativa com focos de infiltrado mononuclear compatível com pneumonia intersticial. Sugestivo de via hematogêna. Abscessos subagudos difusos, presença de diapedese, com infiltrado plasmocítico com complexo de Golgi ativado.                                                                               | Pneumonia abscedativa crônica                     | NR                 | NR                | -                | -    |
| 21     | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular focal com predomínio de mononucleares e espessamento do septo alveolar                                                                                                                                                                                                        | Pneumonia intersticial grave                      | NR                 | NR                | +                | -    |
| 22     | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular focal com predomínio de mononucleares e fibrose discreta                                                                                                                                                                                                                      | Pneumonia intersticial grave                      | NR                 | NR                | -                | -    |
| 23     | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular focal com predomínio de mononucleares.                                                                                                                                                                                                                                        | Pneumonia intersticial discreta                   | NR                 | 4                 | +                |      |
| 24     | Infiltrado mononuclear com hiperplasia de BALT e presença de áreas de atelectasia                                                                                                                                                                                                                                          | Pneumonia intersticial discreta                   | 1024               | 8                 | -                | -    |
| 25     | Hiperplasia de BALT, infiltrado perivascular focal com predomínio de mononucleares                                                                                                                                                                                                                                         | Pneumonia intersticial discreta                   | 1024               | 2                 | -                | -    |

| Animal | Achados histopatológicos                                                                                                                                                            | Diagnóstico histopatológico     | Sorologia<br>Título* |                   | Imunoistoquímica |      |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------|------------------|------|
|        |                                                                                                                                                                                     |                                 | BPI-3 <sup>a</sup>   | BRSV <sup>b</sup> | BPI-3            | BRSV |
| 26     | Infiltrado perivascular e intersticial com predomínio de PMN e presença de áreas de atelectasia                                                                                     | Pneumonia intersticial moderada | 16                   | NR                | -                | +    |
| 27     | Hiperplasia de BAL T discreta e pneumonia intersticial moderada                                                                                                                     | Pneumonia intersticial discreta | NR                   | 4                 | -                | -    |
| 28     | Reação intersticial com presença de macrófagos (pneumócitos tipo II), sem presença de PMN. Infiltrado perivascular com hiperplasia de BAL T.                                        | Pneumonia intersticial moderada | 64                   | 8                 | -                | -    |
| 29     | Predomínio de infiltrado mononuclear com algumas associações com PMN ao redor dos brônquios e vasos (BAL T). Infiltrado perivascular mononuclear com discreta hiperplasia de BAL T. | Pneumonia intersticial moderada | 64                   | 2                 | -                | -    |
| 31     | Pneumonia Intersticial moderada e hiperplasia de BAL T                                                                                                                              | Pneumonia intersticial discreta | NR                   | 8                 | -                | -    |
| 32     | Pneumonia intersticial discreta                                                                                                                                                     | Pneumonia intersticial discreta | NR                   | 4                 | -                | -    |
| 33     | Infiltrado perivascular mononuclear                                                                                                                                                 | Pneumonia intersticial discreta | 64                   | 2                 | -                | -    |
| 34     | Infiltrado perivascular mononuclear                                                                                                                                                 | Pneumonia intersticial discreta | 512                  | 2                 | -                | -    |
| 35     | Hiperplasia de BAL T, com infiltrado perivascular e na parede de vasos com mononucleares e infiltrado intersticial perivascular de PMN.                                             | Pneumonia intersticial grave    | 16                   | 8                 | -                | -    |
| 36     | Infiltrado de PMN e mononucleares, espessamento do septo alveolar e áreas de atelectasia                                                                                            | Pneumonia intersticial moderada | 256                  | 4                 | +                | -    |
| 37     | Hiperplasia de BAL T, congestão com marginação de leucócitos e infiltrado perivascular.                                                                                             | Pneumonia intersticial moderada | 1024                 | 2                 | -                | -    |
| 38     | Pneumonia intersticial moderada e hiperplasia de BAL T discreta.                                                                                                                    | Pneumonia intersticial discreta | NR                   | 2                 | -                | -    |

| Animal | Achados histopatológicos                                        | Diagnóstico histopatológico     | Sorologia<br>Título* |                   | Imunoistoquímica |      |
|--------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------|------------------|------|
|        |                                                                 |                                 | BPI-3 <sup>a</sup>   | BRSV <sup>b</sup> | BPI-3            | BRSV |
| 39     | Pneumonia intersticial moderada e hiperplasia de BAL T discreta | Pneumonia intersticial discreta | NR                   | 4                 | -                | -    |
| 40     | Pneumonia intersticial discreta                                 | Pneumonia intersticial discreta | NR                   | 4                 | -                | -    |

\*Título expresso como o inverso da diluição;min-mínimo; max-máximo

<sup>a</sup> BPI-3: não reagente ≤ 8; <sup>b</sup> BRSV: não reagente ≤ 2 .; NR - Não reagente