

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Mário Celso Sperotto Brum

Ingryd Merchioratto

Uruguaiiana, junho 2016.

INGRYD MERCHIORATTO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Médico Veterinário, Msc, Dr.
Mário Celso Sperotto Brum

**Uruguaiana
2016**

INGRYD MERCHIORATTO

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Virologia

Relatório apresentado e defendido em 20 de junho de 2016

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum
Orientador

Prof^a. Dra. Carolina Kist Traesel
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Tiago Gallina Corrêa
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico esta etapa aos meus pais, Nabor (*in memoriam*) e Aparecida, e a minha irmã Kássia, incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, suporte, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por permitir traçar meu caminho e chegar até aqui. E principalmente ser minha fonte de força e energia inesgotável.

Aos meu pais, Nabor (*in memoriam*) e Aparecida pela educação e orientação sobre os valores da vida. Por nunca terem faltado com paciência, confiança, amor, amparo e por serem a minha base.

À minha irmã Kássia, por ser meu exemplo, por nunca ter desistido de mim e ter me incentivado principalmente nos estudos.

Ao meu namorado Isac por ser meu companheiro e amigo, por ser paciente e proporcionar conforto principalmente nessa etapa importante de conclusão do curso.

Ao amigo da família, Israel Giraldi, pela amizade, amparo, dedicação e orientação.

Aos meus amigos de infância, Mariana, Thiago e Henrique, que mesmo longe fisicamente sempre fizeram-se presentes.

A UNIPAMPA que me proporcionou oportunidades ao longo da minha trajetória, e principalmente aos meus professores, pela paciência, amizade, ensinamentos e conhecimentos repassados, contribuindo, sem medir esforços, para minha formação.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, Debora, Eteiele, Diane, Bruna, Janice, Gabriela Döwich, Rafaela, Andressa, Felipe e Lucas, tornaram a distância da minha família mais suportável.

A todos que fizeram parte da equipe do laboratório de virologia da UNIPAMPA, pela convivência, aprendizado e amizade.

Ao meu orientador Prof. Mário, por acima de tudo ser uma pessoa incrível o qual tenho como exemplo, pelos aprendizados ao longo da graduação, amizade, disponibilidade e paciência.

Aos meus supervisores de estagio Rejane Schaefer e Eduardo Furtado Flores, e suas equipes, pela convivência, oportunidades e ensinamentos.

Muito Obrigada!

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir e chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no incerto caminho da vida que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE VIROLOGIA

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), realizado na área de virologia. O ECSMV teve orientação do professor Mário Celso Sperotto Brum, supervisão da pesquisadora Rejane Schaefer e do professor Eduardo Furtado Flores. O estágio foi dividido em duas etapas, sendo a primeira realizada na Embrapa Suínos e Aves e a segunda no Setor de Virologia (SV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O período de estágio foi de 18 de janeiro a 20 de maio de 2016, perfazendo 548 horas. Durante o período de estágio, foi possível acompanhar diferentes técnicas de virologia básica e molecular, projetos de pesquisas com viroses de suínos, caninos e bovinos, além de auxiliar no processamento de amostras para diagnóstico e produção de vacinas autógenas. Serão descritas as técnicas acompanhadas e/ou realizadas como cultivo celular, congelamento e descongelamento de células, isolamento viral, inoculação em ovo embrionado, amplificação viral, imunocromatografia, imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, soroneutralização, reação em cadeia da polimerase (PCR) e RT-PCR (transcrição reversa).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1- Ovoscopia. Ovo com embrião de nove dias com aparência viável (A). Ovo com embrião morto, o que pode ser evidenciado pela presença da faixa de vasos sanguíneos reunidos (alo) (B).....22
- FIGURA 2- Células VERO coradas pela técnica de imunofluorescência indireta para o vírus da cinomose (CDV). Células negativas, não infectadas (A), células positivas, infectadas e marcadas em verde (B).....24
- FIGURA 3- Imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Esquema das rosetas na placa de petry e da disposição do antígeno, controle positivo e amostras testes em cada unidade de teste (A). Resultado do teste de IDGA, linhas de precipitação (seta verde) indicando amostras positivas e ausência da linha (seta vermelha) em amostras negativas.....26
- FIGURA 4- Teste imunocromatográficos para vírus da cinomose canina. Demonstração de amostras negativas para presença de vírus, com marcação da linha vermelha no controle indicando que o teste esta funcionando (A). Demonstração de amostra positiva com marcação da linha vermelha no local da amostra teste e do controle(B).....27
- FIGURA 5- Técnica de Soroneutralização para herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV 2). Amostras testes de animais soropositivos para BoHV 2 (A) e soronegativos (B).....28

LISTA DE TABELA

TABELA 1- Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante o ECSMV realizado no LSGA da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia (SC).....	16
TABELA 2- Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante o ECSMV realizado no SV.....	17
TABELA 3- Solicitações de diagnóstico virológico e/ou produção de vacina autógena submetidas ao Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, durante o período de 14 de março à 20 de maio de 2016.....	32

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
2- ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
2.1 Local de realização do estágio	13
2.1.1 Embrapa Suínos e Aves	13
2.1.2 Setor de Virologia.....	14
2.2 Descrições das atividades	16
2.2.1 Cultivo celular	17
2.2.2 Congelamento e descongelamento celular	19
2.2.3 Isolamento viral	20
2.2.4 Inoculação em ovo embrionado.....	21
2.2.5 Amplificação viral em cultivo celular	22
2.2.6 Imunofluorescência indireta (IFI).....	23
2.2.7 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)	25
2.2.8 Imunocromatografia	26
2.2.9 Soroneutralização por <i>screening</i> (qualitativo) (SN).....	27
2.2.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
2.2.11 Diagnóstico.....	31
2.2.12 Processamento de tecidos para isolamento.....	32
2.2.13 Produção de vacina para papilomatose.....	33
3- DISCUSSÃO.....	34
3.1 Influenza suína.....	34
3.2 Cinomose canina	37
3.3 Mamilite herpética.....	40
4- CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	49

1- INTRODUÇÃO

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi desenvolvido na área de virologia, sob a orientação do Prof. Mário Celso Sperotto Brum. Foram escolhidos dois laboratórios para o desenvolvimento do ECSMV, o Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPSA, EMBRAPA), no município de Concórdia (SC), e o Setor de Virologia (SV), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS). A primeira etapa, realizada entre 18 de janeiro e 04 de março de 2016 (180 horas), teve a supervisão da pesquisadora Rejane Schaefer e foi realizada no Laboratório de Genética e Sanidade Animal (LGSA) do CNPSA. A segunda etapa foi realizada no SV sob a supervisão do Prof. Eduardo Furtado Flores, no período de 14 de março a 20 de maio de 2016 (368 horas). A totalização da carga horária de estágio realizada nos dois locais foi de 548 horas.

As atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas no LGSA foram relacionadas com virologia suína, onde acompanhou-se projetos de pesquisa e o monitoramento sanitário de rebanhos pela coleta de amostras para triagem e/ou confirmação do diagnóstico de suspeita clínica. Estas amostras eram provenientes de granjas particulares, agroindústrias ou laboratórios parceiros. Dentre as atividades acompanhadas neste local estão coleta e processamento de amostras, manutenção de cultivos celulares, isolamento viral em células de linhagem e em ovos embrionados e detecção viral pelo teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). Adicionalmente, foi possível acompanhar o manejo de partos e recém-nascidos, coleta de sêmen e inseminação artificial (IA), tuberculinização e coleta de sangue na granja de suínos da unidade do CNPSA. Também visitou-se a granja de aves da unidade, sendo possível acompanhar o teste da Púlorose.

No SV as atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas foram direcionadas para a virologia básica e veterinária, foi possível manipular diferentes espécies de vírus, permitindo estudar o seu comportamento *in vitro*, *in vivo* e realizar diferentes técnicas de diagnóstico. Entre as técnicas acompanhadas pode-se citar isolamento viral em cultivo celular, quantificação viral, imunofluorescência (IFA), PCR e RT-PCR, imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e soroneutralização por *screening* (qualitativa). Também foi possível participar da

rotina de manutenção, congelamento e descongelamento de linhagens celulares, coleta de sangue equino, bem como a lavagem, esterilização e organização do material utilizado na rotina. Além dessas atividades, também houve participação na disciplina da pós-graduação Doenças Víricas, ministrada pelo professor Rudi Weiblen, e discussões de artigos.

Cada vez mais as infecções causadas por microrganismos, sejam elas por fungos, parasitos, bactérias ou vírus, ganham importância no cenário mundial e tornaram-se foco de atenção. Destacando as infecções causadas por vírus, é possível ressaltar as notícias de ocorrência de doenças endêmicas, emergentes e re-emergentes (PROMED MAIL, 2016). E, é diante desses fatos que a importância da virologia e o diagnóstico laboratorial tem aumentado. Além disso, há o perfil da saúde pública, fatores econômicos, movimentação de animais e criação de animais para companhia, lazer e esporte (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). O conhecimento científico sobre os vírus e as infecções víricas é fundamental, pois através dele é possível conhecer o perfil do agente e da doença, e assim elaborar programas de sanidade para controlar, erradicar e prevenir o acontecimento das mesmas (FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

2- ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Local de realização do estágio

2.1.1 Embrapa Suínos e Aves

A EMBRAPA foi criada em 1973 com o objetivo de desenvolver um modelo de agricultura e pecuária para os diferentes perfis do Brasil, auxiliando na superação das barreiras que limitam a produção. Está vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e mantém parceria com o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) para desenvolvimento de projetos e pesquisa (EMBRAPA, 2016).

A sede da empresa está localizada em Brasília e as unidades de pesquisa são descentralizadas e encontram-se distribuídas por todo o território brasileiro, sendo composta por 16 escritórios e 47 unidades descentralizadas. Além destas unidades, a EMBRAPA possui cooperação e rede de colaboração com diversos laboratórios e organizações do mundo. A EMBRAPA Suínos e Aves encontra-se no distrito de Tamanduá, cidade de Concórdia, região oeste de Santa Catarina (SC). Esta unidade corresponde a uma das 47 unidades, fundada no ano de 1975 em uma área de 210,74 hectares (ha) e possui 50.351,37m² de área construída. A unidade possui um prédio administrativo, biblioteca, dois complexos de laboratórios, área de isolamento e necropsia, campos experimentais, fábrica de concentrados, biotério e estação meteorológica. Além de contar com uma área de produção de aves e incubatório, uma unidade de produção de suínos e outras estruturas de apoio. Esta unidade conta com uma capacidade de alojamento para 50 mil aves e seis mil suínos (EMBRAPA, 2016).

Os complexos laboratoriais são compostos por dois grandes conjuntos de laboratórios e possui 211 colaboradores, dentre estes 51 são pesquisadores, 55 analistas, 37 técnicos e 68 assistentes, buscando desenvolver soluções em pesquisa e inovação para as áreas da suinocultura e avicultura. O Laboratório de Análises Físico-Químicas é direcionado para a pesquisa em meio ambiente, solo, fertilizantes, bioenergia, nutrição e qualidade da carne. O Laboratório de Sanidade e Genética Animal (LSGA) é voltado para pesquisas na área de

sanidade de suínos e aves, bem como para realização de estudos na área de genômica de suínos e aves (EMBRAPA, 2016).

O LSGA foi criado em 1982 tendo como objetivo a pesquisa nas áreas de sanidade e genética de aves e suínos, onde são desenvolvidas metodologias e adaptadas à rotina quando viáveis, sendo estas disponibilizadas para parceiros de pesquisa e clientes. Após duas reformas, a fim de atender as Normas de Biossegurança e as Normas de Boas Práticas de Laboratório, o LSGA é considerado laboratório com Nível de Biossegurança 2 (BL-2). As atividades do laboratório envolvem as áreas de bacteriologia, virologia, reprodução, genética molecular e histopatologia. Além de dar suporte as granjas da EMBRAPA Suínos e Aves e prestar serviços e monitorar o rebanho (EMBRAPA, 2016).

2.1.2 Setor de Virologia

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) foi criada em 1960, a partir da reunião de faculdades já existentes na cidade (SIE, 2016; UFSM, 2016). No ano de 1983, iniciaram-se as atividades do Setor de Virologia (SV). O SV é vinculado aos Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) (SV/UFSM, 2015). O laboratório dá suporte para as disciplinas da graduação e pós-graduação, desenvolve atividades de pesquisa e realiza diagnóstico e treinamento em Virologia Animal. Dentre esses serviços, pode-se citar o diagnóstico de infecções víricas em pequenos e grandes animais, produção de vacina para papilomatose bovina, equina e canina, produção de antígeno para diagnóstico sorológico da leucose enzoótica bovina, anticorpos monoclonais para diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus do tipo 5 (BoHV-5) (DMVP, 2004).

O SV atualmente está situado no prédio 63 A, parque de exposições, campus da UFSM, no bairro de Camobi, em Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS). O prédio é composto por três pavimentos, sendo que no primeiro andar localizam-se oito salas individuais com diversas finalidades. Além da recepção, existem salas que são separadas em: i) sala de diagnóstico (utilizada para a manipulação das amostras recebidas do campo); ii) sala de lavagem/esterilização; iii) sala de equipamentos (com refrigeração constante, serve para armazenamento dos freezers e botijões de nitrogênio); sala de cultivo celular e de vírus; iv) sala de meios; v) sala de biologia molecular, vi) sala escura para o microscópio de imunofluorescência; vii) sala de biossegurança (para manipulação do vírus da raiva e febre

amarela) e viii) sala para os estagiários/bolsistas. No segundo andar, localizam-se as salas dos professores, uma sala para os estudantes da pós-graduação e uma cozinha com refeitório. O terceiro andar encontra-se desativado para reforma e este espaço futuramente será destinado para as aulas da graduação e pós-graduação. Atualmente o SV conta com 21 integrantes, dois professores, um pós doutorando, cinco doutorandos, cinco mestrandos, oito bolsistas/estagiários.

2.2 Descrições das atividades

Os dois locais de estágios, LGSA e SV, desenvolvem atividades de ensino, pesquisa e extensão relacionadas com virologia e doenças víricas. Durante o estágio foi possível acompanhar diversas atividades que estavam em andamento e realizar técnicas empregadas na rotina dos laboratórios. Assim, serão abordadas as diferentes técnicas observadas e realizadas em ambos locais de estágio, como também técnicas semelhantes entre os locais. Para um melhor entendimento, todas as atividades são apresentadas em duas tabelas, separadas de acordo com o local (TABELA 1 e TABELA 2).

TABELA 1- Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante o ECSMV realizado no LSGA da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia (SC).

Atividades	Número	%
Apresentação e discussão de seminário	3	10,7
Atividades desenvolvidas na granja de aves	*	---
Atividades desenvolvidas na granja de suínos	**	---
Coleta de amostras	1	3,5
Cultivo celular	9	32,1
Extração DNA/RNA	2	7,1
Inoculação em células	2	7,1
Inoculação em ovos	1	3,5
Necropsia	1	3,5
PCR	5	17,8
Processamento de tecidos	1	3,5
RT-PCR	1	3,5
Transcrição RNA- cDNA	2	7,1
TOTAL	28	100

* Atividade realizada por dois dias na granja de aves para monitoramento de *Salmonella Pullorum*; ** Atividades desenvolvidas no período de uma semana na granja de suínos, envolvendo o acompanhamento de coleta de sangue e exame de tuberculose, acompanhamento de parto e manejo de leitões recém-nascidos, coleta de sêmen e inseminação artificial em suínos.

TABELA 2- Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante o ECSMV realizado no SV.

Atividades	Número	%
Amplificação viral	14	16,8
Aula da Pós-Graduação	9	10,8
Coleta de sangue	2	2,4
Congelamento celular	7	8,4
Cultivo celular	*	---
Descongelamento celular	12	14,4
Discussão de artigo	**	---
Imunocromatografia	4	4,8
Imunodifusão em gel de ágar	4	4,8
Imunofluorescência	5	6
Inibição da hemaglutinação	1	1,2
Lavagem e esterilização	***	---
Produção de vacina autógena para papiloma	6	7,2
Reação da cadeia em Polimerase	1	1,2
Recebimento de amostras para diagnóstico	****	---
Soroneutralização qualitativa	15	18
Titulação viral	3	3,6
TOTAL	83	100

* O cultivo celular era atividade de rotina sendo realizada diariamente, não sendo possível quantificar. ** As discussões de artigos ocorriam semanalmente, onde foi possível participar das discussões com a pós-graduação e com a graduação. *** A lavagem e esterilização também fazia parte da rotina do laboratório, não sendo possível contabilizar. **** As amostras chegavam diariamente no SV, sendo que nesse período totalizou-se 616.

2.2.1 Cultivo celular

O termo “cultivo” é utilizado para a multiplicação de células *in vitro*, em recipientes apropriados e em ambiente artificial, formando uma monocamada (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2015). Atualmente as técnicas moleculares ganham espaço tanto na pesquisa como no diagnóstico, porém o cultivo celular ainda possui grande importância para estudo dos vírus, sendo utilizado para técnicas de titulação viral, multiplicação e isolamento do vírus,

além da utilização para produção de vacinas, avaliação dos mecanismos de ação de drogas e resposta imune (ICB, 2016).

Durante o estágio na Embrapa, foi acompanhado o cultivo celular da linhagem H1299, proveniente de carcinoma de pulmão humano, utilizada para isolar o Senecavírus A. As células foram cultivadas em garrafas T25 (com área de crescimento de 25 cm²) mantidas em estufa a uma temperatura de 37 °C, com gás carbônico (CO₂) a 5%. Para que as células permanecessem viáveis no cultivo, elas passavam por um processo chamado de manutenção. A manutenção visa disponibilizar espaço na garrafa de cultivo e nutrientes (meio e soro) para que as células continuem a crescer. Comparada a outras células, a H1299 permanecia por um período maior até a próxima passagem, em média a cada sete dias. Entretanto, durante o período entre uma e outra passagem o meio de cultivo era trocado, de acordo com a necessidade, após a avaliação da monocamada.

O procedimento de manutenção consiste na remoção cuidadosa do sobrenadante para um recipiente de descarte e lavagem da monocamada de células com solução salina de fosfatos (PBS), repetindo três vezes o procedimento. Após o descarte do PBS, acrescentava-se solução de tripsina versene (TVS) e a garrafa era mantida em estufa de CO₂ por 10 minutos para o desprendimento das células. Com as células individualizadas, acrescentava-se o Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para a homogeneização das células. Do volume total, 3 mL, descartava-se a quantidade necessária para restarem em torno de 16% de células, ou seja, um volume de 0,5 mL, na última etapa, acrescentava-se 4,5 mL de meio RPMI retornando a garrafa para a estufa para o desenvolvimento das células. O meio utilizado, era enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB). A cada processo de manutenção das células se considerava que elas sofreram uma passagem, ou seja, servia como indicativo de quantas passagens as células já haviam sido submetidas.

Na segunda etapa do estágio, realizada no setor de virologia da UFSM, também foi possível cultivar algumas linhagens celulares, dentre elas pode-se citar: células resistentes a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (CRIB), célula de rim canino (MDCK), célula de rim de macaco-verde-africano (VERO) e célula de rim de cordeiro infectada com o vírus da leucose enzoótica bovina (FLK). As células eram mantidas em garrafas de cultivo celular de plástico, com meio essencial mínimo (MEM) ou RPMI, conforme a necessidade do tipo celular, e adicionado 10% SFB.

A manutenção do cultivo era realizada conforme a necessidade de uso da célula ou quando a monocamada celular atingisse 100% de confluência. De um modo geral, o processo de passagem celular era semelhante ao sistema utilizado na Embrapa Suínos e Aves, com a

diferença que no SV/UFSM não se utilizava PBS para a lavagem, sendo somente tripsina. Ou seja, no momento de realizar a passagem celular, o sobrenadante era descartado e adicionado 20% de tripsina do volume final para lavagem do tapete, e em seguida este volume era descartado. Novamente era adicionado 20% de tripsina e a garrafa era incubada por 10 minutos na estufa de CO₂ a 37° C. Após o desprendimento total do tapete celular, as células eram ressuspensas e individualizadas e descartava-se uma quantia celular, sendo normalmente 1:2, ou seja, metade do conteúdo da garrafa, caso não houvesse interesse de amplificar as células. Adicionava-se 80% de meio, 10% SFB e incubava-se na estufa novamente.

2.2.2 Congelamento e descongelamento celular

Com a técnica de congelamento e descongelamento celular é possível conservar as células, de modo que sua capacidade proliferativa e viabilidade celular devem ser preservadas, possibilitando a interrupção e a retomada de cultivo (MARTINS, 2005). O armazenamento em nitrogênio líquido é considerado a melhor forma para estocagem das células, conferindo a preservação adequada. Além disso, o congelamento celular é fundamental para a montagem de um banco de células (MARTINS, 2005). Durante o ECSMV foi possível realizar congelamento e descongelamento de linhagens celulares como MDCK, CRIB, VERO e FLK. A realização desses procedimentos era baseada no protocolo adaptado pelo próprio laboratório.

Para o congelamento celular, o ideal era realizar a manutenção das células no dia anterior e assim atingir pico de sua atividade metabólica para congelar. As células destinadas para congelamento eram tripsinizadas e ressuspensas para retirar todo o conteúdo que pudesse estar aderido e então colocadas em tubos e centrifugadas por dois minutos, a 2000 rpm em temperatura ambiente. Para congelar as células, segundo o protocolo adaptado pelo SV, devia ser feita uma solução de congelamento contendo 50% de soro fetal bovino, 40% de meio (MEM ou RPMI) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a centrifugação, formava-se um *pellet* de células no fundo do tubo, onde era descartado o sobrenadante. Esse *pellet* era ressuspensado com os 40% do meio, e colocado em criotubos (microtubo para congelamento) contendo já a quantidade necessária de soro e DMSO. Após a deposição do meio e células, a solução era homogeneizada e colocada juntamente com tubos em uma caixa de isopor na

geladeira por duas horas, depois eram colocados no freezer -70°C *overnight*, e no dia seguinte, colocados no nitrogênio líquido para armazenamento. O congelamento das células deve ser gradual, pois assim não haverá a formação de cristais intracelular e o consequente rompimento das membranas (SILVA, 2007). Após o congelamento no nitrogênio, era indicado descongelar um criotubo para certificar a eficácia do congelamento.

O descongelamento celular também era baseado no protocolo do laboratório, de maneira que as células deviam ser descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C , sob leve e constante agitação. Após o total descongelamento, o microtubo era centrifugado por dois minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e adicionado um mL de meio de cultivo próprio para as células e ressuspenso. Posteriormente, o conteúdo era transferido para uma garrafa de cultivo T25 e adicionado 10% de soro fetal bovino e adicionado mais 70% de meio. Depois de duas a três horas do descongelamento, era indicado remover o meio juntamente com as células que não se aderiram e repor o meio mais soro.

2.2.3 Isolamento viral

As técnicas de biologia molecular tornaram-se mais sofisticadas e rápidas, sendo muitas vezes a opção de escolha para o diagnóstico. Contrapondo, o isolamento viral em sistema biológico (ovo embrionado, cultivo celular e animais), é um método clássico e importante para a isolamento do vírus, além de avaliar a infectividade do vírus (FLORES, 2012). Durante o ECSMV o isolamento de senecavírus A foi realizado em células da linhagem H1299. O inóculo utilizado para a atividade correspondia a sobrenadante de cultivo proveniente de uma inoculação anterior (passagem 1), feita a partir da amostra de campo, originária de casos clínicos. A amostra consistia de órgãos e tecidos de suínos que apresentavam lesões vesiculares, as quais foram encaminhadas ao LSGA pela empresa Brasil Foods S.A. (BRF).

Para realizar o isolamento, garrafas de células (25 cm^2) eram preparadas no dia anterior à inoculação do vírus. A inoculação nesse período visou sincronizar a infecção do vírus em um momento onde as células encontravam-se em estágio de plena atividade de multiplicação celular (mitose), o que favorece a replicação do vírus intracelularmente. No dia da inoculação, as garrafas eram observadas ao microscópio, para verificar se a monocamada

celular apresentava-se confluenta (60 a 80% de confluência). Para a inoculação, o meio da garrafa foi descartado e a monocamada lavada com PBS por três vezes. Posteriormente, foi adicionado 1 mL do inóculo (suspensão contendo a amostra suspeita), e a garrafa foi mantida em estufa contendo CO₂, por uma hora para a adsorção viral. Após este período, foi acrescentado meio de cultivo e a garrafa foi colocada na estufa por até cinco dias. avaliações diárias Foram realizadas com o intuito de detectar a presença de efeito citopático (ECP), causado pela replicação do vírus.

Durante o estágio, não foi possível observar efeito citopático após uma passagem em células. Diante disso, as células inoculadas foram congeladas e descongeladas, o conteúdo coletado e centrifugado a 3000 rpm a 4°C por cinco min. O sobrenadante foi coletado e inoculado em uma nova garrafa de célula. Esse procedimento era realizado a cada cinco dias. Dependendo da presença de ECP, o procedimento era repetido até cinco vezes, ou seja, até a quinta passagem.

2.2.4 Inoculação em ovo embrionado

Os ovos embrionados são utilizados tanto para isolamento quanto cultivo viral, pois os tecidos do embrião de galinha são considerados um sistema ideal para multiplicação de vários vírus (BRUM & WEIBLEN, 2012). Além disso, esse método confere boa sensibilidade e facilidade de manipulação, porém requer ovos livres de patógenos (SPF) e é restrito aos vírus que se replicam em embrião de galinha (FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

A inoculação em ovos foi acompanhada no período de estágio e teve como finalidade o isolamento e titulação do vírus influenza A, para seleção de amostras a serem utilizadas em projeto de pesquisa. Os ovos utilizados eram originados de um sistema livre de patógenos específicos, pertencente à Embrapa. ovos com nove dias de incubação Foram utilizados , sendo realizada a seleção dos mesmos pela avaliação da viabilidade detectada pela ovoscopia (FIGURA 3A). No laboratório, os ovos foram novamente avaliados e separados conforme o tamanho, característica da casca, e se o embrião estava vivo. A partir da seleção, os ovos eram desinfetados com álcool 70° e identificados com o número da amostra a ser inoculada. Em sequência os ovos eram furados com o furador (agulhada adaptada) e inoculados no líquido cório-alantóide (LCA) com a amostra de vírus. As aberturas na casca do ovo eram vedadas com cola branca e encaminhados à incubadora.

As três amostras utilizadas no isolamento em ovos eram procedentes de uma P1 (passagem 1) originário de um outro ovo inoculado. As amostras utilizadas apresentaram títulos de HA (hemaglutinação) entre 1:1024 e 1:2048. Foram inoculados 20 ovos por amostra, totalizando 60 ovos. Dez ovos foram mantidos como controles negativos (cinco ovos foram inoculados com PBS e cinco ovos não foram inoculados). Após a inoculação, os ovos permaneceram na incubadora por quatro dias, sendo resfriados a 4° C por quatro horas para coleta do LCA. Caso fosse detectada morte embrionária (FIGURA 3B) até 24 horas após a inoculação, o ovo era descartado. Mortalidade embrionária após 24 horas da inoculação, o ovo era armazenado em geladeira (4° C) para o LCA ser coletado.

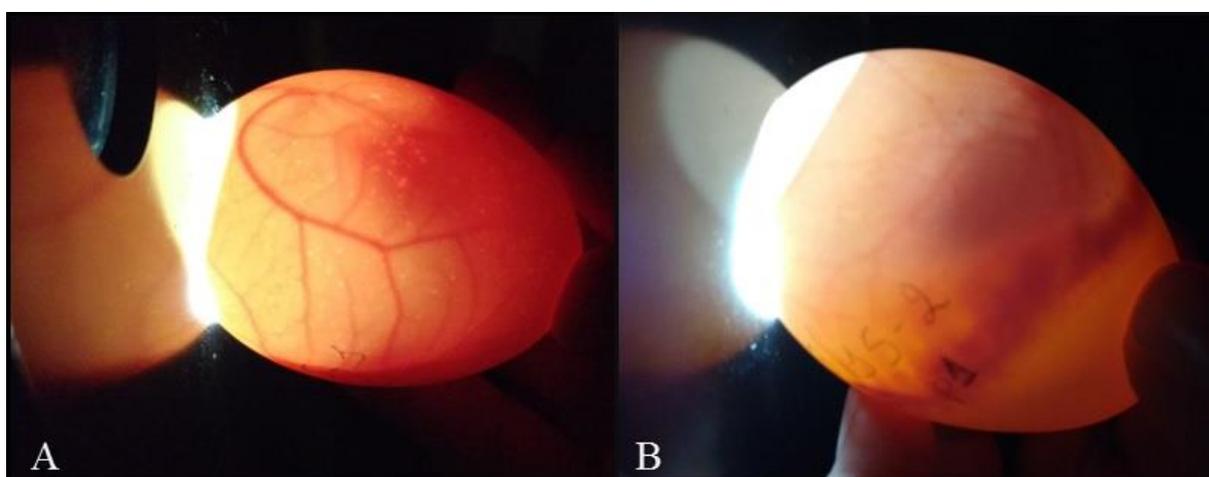


FIGURA 1- Ovoscofia. Ovo com embrião de nove dias com aparência viável (A). Ovo com embrião morto, o que pode ser evidenciado pela presença da faixa de vasos sanguíneos reunidos (alo) (B)

2.2.5 Amplificação viral em cultivo celular

Os vírus são necessários para realizar alguns testes sorológicos (soroneutralização, inibição da hemaglutinação), utilizados como imunógenos em vacinas e produção de antígenos para imunizar animais (antissoro e anticorpo). Para esses procedimentos virológicos, são necessárias grandes quantidades de vírus, sendo essencial sua amplificação em sistemas biológicos. São três sistemas utilizados: inoculação em animais suscetíveis, em ovo embrionado ou em cultivo celular (BRUM & WEIBLEN, 2012). Para diagnóstico virológico, o isolamento em cultivo celular é considerado *golden standard* (prova ouro). Além de que, para se obter uma grande quantidade de vírus viável para pesquisa e produção de

vacina, o cultivo celular ainda é a forma mais econômica e simples a ser utilizada (BRUM & WEIBLEN, 2012).

Durante o ECSMV a amplificação viral foi realizada com o vírus da Cinomose canina (CDV) em células da linhagem VERO. No primeiro momento, 24hrs antes, foi preparado uma placa de cultivo celular de 24 poços. As amostras virais inoculadas eram amostras já adaptadas ao cultivo celular. Para inocular, foi retirado todo o sobrenadante e adicionado 150µl do inoculo e colocado no agitador de placas por cerca de uma hora para adsorção do vírus. Posteriormente, por serem amostras de vírus já adaptadas, não foi necessário retirar o inoculo, sendo apenas adicionado 5% de soro fetal bovino e quantidade suficiente de meio RPMI para completar o volume de 500µL. A partir da inoculação, as células foram monitoradas diariamente, após 48 horas o sobrenadante foi coletado e as células usadas para o teste de imunofluorescência (IFA). Nos poços com células positivas na IFA, o sobrenadante era amplificado em frascos T25.

Para a inoculação, foi reservado 500µL do conteúdo da garrafa (meio e soro) e adicionado 500µL do inóculo, e deixado por uma hora no agitador para adsorção. Posteriormente, foi adicionado 10% de SFB e quantidade suficiente de meio para completar um volume de 5 mL, e mantido na estufa de CO₂. Apresentando ECP, o sobrenadante foi aliquoteado em microtubos de 200µL e armazenados em freezer -70°C. A presença viral foi confirmada pela imunofluorescência.

2.2.6 Imunofluorescência indireta (IFI)

A técnica de imunofluorescência tem sido utilizada tanto para detecção de antígenos quanto anticorpos (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Essa, é uma técnica considerada rápida e de fácil execução, porém deve ser interpretada com cautela devido à presença de reações inespecíficas. Apesar de ser relativamente restrita a sua utilização, a IFA ainda é hoje, utilizada para teste de diagnóstico de diversos vírus (FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

Durante o ECSMV, foi possível realizar a técnica, sendo essa utilizada para confirmar a presença ou ausência do vírus da cinomose em cultivo celular. A técnica foi realizada com lâminas preparadas a partir de cultivo celular infectado. Para o preparo da lâmina é importante que a monocamada celular inoculada não esteja comprometida devido a replicação viral. As células inoculadas e cultivadas nas placas de 24 cavidades foram tripsinizadas com 150µL de

tripsina, incubadas na estufa e ressuspendidas com 350 μ L de meio e 10% de soro. Cada poço da lâmina *multispot* foi preparado com 20-40 μ l da suspensão de células. A lâmina era incubada na estufa de CO₂ por aproximadamente duas horas, neste processo utilizou-se um recipiente com papel umedecido (câmara úmida) para evitar o ressecamento. Após a aderência das células, a lâmina é fixada em acetona 100%, estando pronta para iniciar o teste de IFA ou então para o armazenamento sob refrigeração.

Basicamente, para realizar a técnica de IFI, utiliza-se dois anticorpos, sendo o primeiro anticorpo específico para o antígeno, e o segundo anticorpo, conjugado com fluoresceína, que reconhece o anticorpo primário. Como anticorpo primário foi utilizado um anticorpo primário monoclonal anti-CDV (1:40) e incubado por uma hora em estufa. Após esse período a lâmina foi lavada três vezes com PBS e água para retirar os resíduos. O anticorpo secundário anti-*mouse* FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) na diluição 1:100 foi adicionado e incubado por uma hora. Ao final, a lâmina foi novamente lavada, como descrito acima, e corada com solução de azul de EVANS por 10 minutos. Este reagente cora as células em vermelho e facilita a visualização da marcação da fluoresceína. Após essas etapas, a lâmina foi observada em microscópio de epifluorescência. A leitura da técnica consiste na observação de células infectadas pelo vírus, que devido a fluoresceína, estarão marcadas na cor verde. Já as células negativas, por não apresentarem o vírus, os anticorpos não se ligam sendo visualizadas na cor vermelha. A figura a seguir exemplifica células negativas e células positivas para o teste de IFI para cinomose.

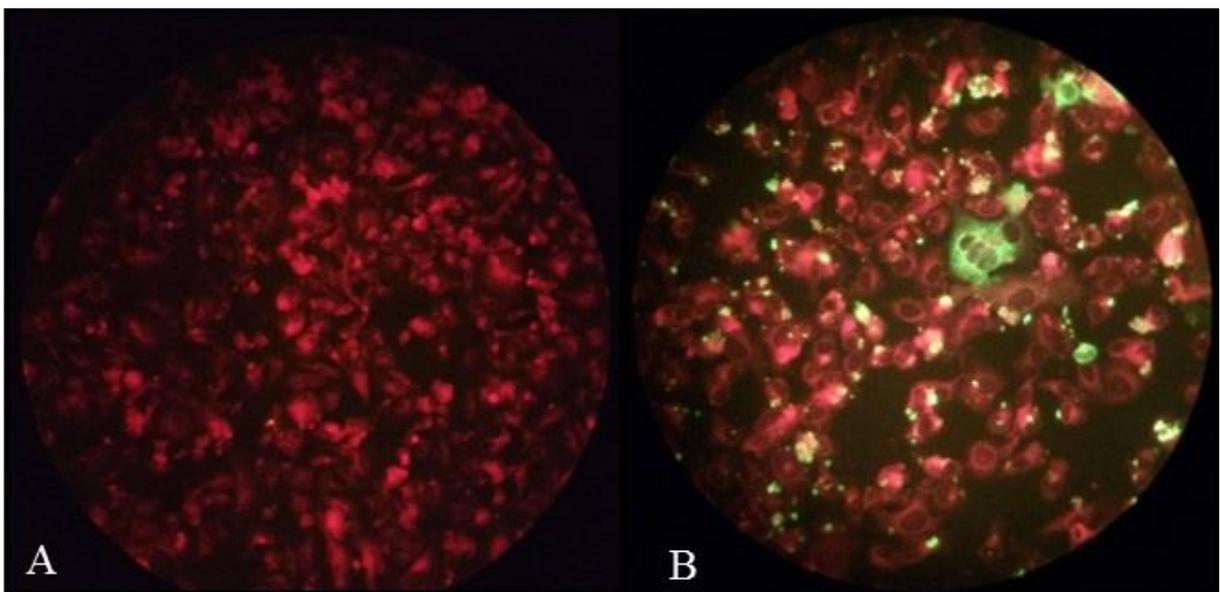


FIGURA 2- Células da linhagem de rim de macaco verde coradas pela técnica de imunofluorescência indireta para o vírus da cinomose. Células negativas, não infectadas (A), células positivas, infectadas e marcadas em verde (B).

2.2.7 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

A IDGA consiste na difusão de antígeno e anticorpo em um meio poroso e a formação de complexos quando ocorre a interação entre esses reagentes. A reação positiva será evidenciada pela formação de uma linha no gel de agarose, resultado da precipitação do complexo (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Essa técnica apresenta boa especificidade e sensibilidade, baixo custo e de fácil execução. A IDGA é considerada o teste oficial de diagnóstico para vírus da leucose enzoótica bovina (BLV), vírus da língua azul (BTV) e anemia infecciosa equina (EIAV) (FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

Durante o ECSMV foi possível acompanhar a técnica de IDGA para diagnóstico de BLV. Como primeiro passo preparava-se o gel de agarose com sais, conforme protocolo padrão, e após solidificado eram feitos orifícios para deposição das amostras testes, controles positivos e antígenos. Os orifícios eram feitos com o auxílio de um perfurador no formato de roseta contendo 7 furadores (FIGURA 3A). No poço central colocava-se o antígeno, em dois poços periféricos (superior e inferior) era reservado para controle positivo, e os demais poços laterais para as amostras a serem testadas. Após a deposição das amostras, controles e antígeno, a placa era incubada em uma caixa térmica contendo algodão úmido, para evitar o ressecamento do gel. A leitura era realizada após 72 horas. Como a técnica consiste na detecção de anticorpo nas amostras suspeitas, a presença de linha opaca entre o antígeno e a amostra teste indicou positividade. Já a ausência desta linha indicou que a amostra teste era negativa (FIGURA 3B).

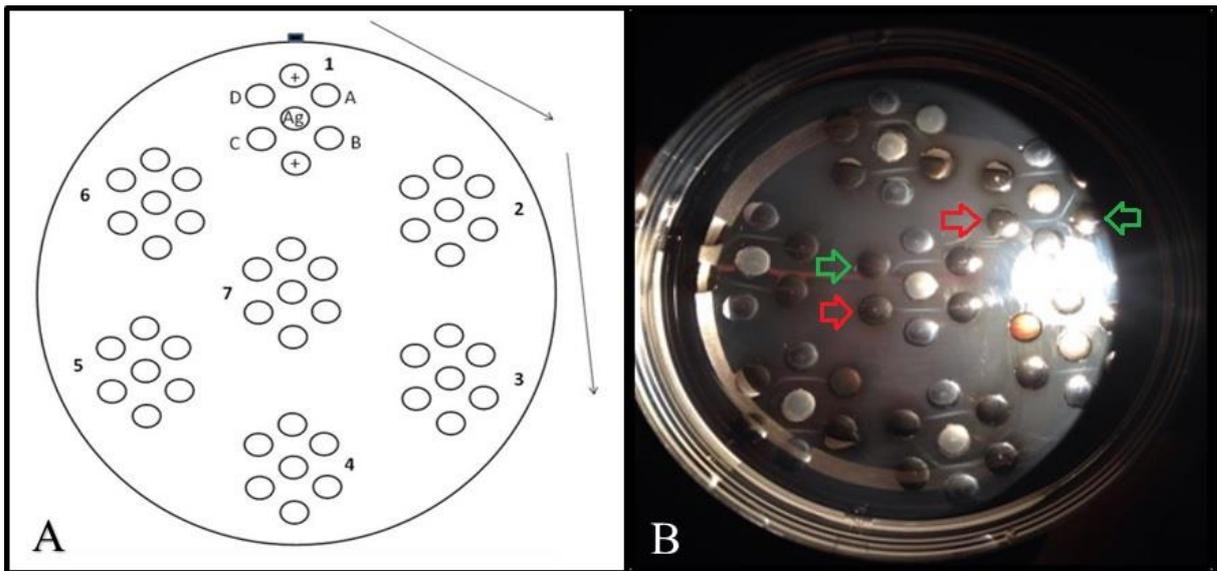


FIGURA 3- Imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Esquema das rosetas na placa de petri e da disposição do antígeno, controle positivo e amostras testes em cada unidade de teste (A). Resultado do teste de IDGA, linhas de precipitação (seta verde) indicando amostras positivas e ausência da linha (seta vermelha) em amostras negativas.

2.2.8 Imunocromatografia

O teste de imunocromatografia baseia-se na reação entre antígeno e anticorpo, porém ocorre através de capilaridade em membrana de nitrocelulose (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Este teste é rápido e simples de realizar e portanto, pode ser utilizado em consultórios, clínicas e a campo. Além disso, existe no mercado *kits* imunocromatográficos para detecção de antígenos para uma ampla variedade de vírus como parvovirus canino e felino, vírus da leucemia felina, vírus da gastroenterite transmissível, vírus da influenza aviária, adenovírus canino, vírus da cinomose canina e vírus da diarreia viral bovina (FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

O SV realiza o teste de imunocromatografia para o vírus da cinomose canina e da parvovirose canina. Durante o período de estágio, foi possível acompanhar e realizar imunocromatografia para diagnosticar cinomose canina. O teste era realizado com o *kit FASTest® DISTEMPER Strip (MEGACOR Diagnostik GmbH, Austria)*. A realização do teste consiste na deposição em um tubo de 500µl da amostra a ser testada (líquor, urina, secreção ocular), dez gotas da solução tampão que acompanha o *kit* e posterior embebição da fita teste

por um minuto. Após esse período, a fita era retirada e deixada em repouso em uma superfície plana, em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, realizava-se a leitura. Nas amostras positivas observa-se uma linha de cor vermelha em uma região determinada da fita. Nas amostras negativas esta linha não era observada. A fita possui um controle interno que serve para validar a execução da prova. Assim, em todos os testes este controle deve apresentar reação. No caso deste controle não reagir, a leitura da prova é invalidada. A Figura 4 exemplifica testes positivo e negativo para CDV.



FIGURA 4- Teste imunocromatográficos para vírus da cinomose canina. Demonstração de amostra negativa para presença de vírus, com marcação da linha vermelha no controle indicando que o teste está funcionando (A). Demonstração de amostra positiva com marcação da linha vermelha no local da amostra teste e do controle (B).

2.2.9 Soroneutralização por *screening* (qualitativo) (SN)

A soroneutralização (SN) é um teste capaz de detectar anticorpos neutralizantes para o vírus. A técnica de SN, entre todas as técnicas sorológicas, é a mais semelhante a interação entre anticorpos e antígeno que ocorre *in vivo*. O teste de SN pode ser realizado com o objetivo qualitativo, indicando se a amostra é positiva ou negativa, ou quantitativo, indicando o título (concentração) dos anticorpos (FLORES & CARGNELUTTI, 2012)

No período do estágio, foi realizado SN qualitativa, também denominada *screening*, para pesquisa de anticorpos específicos para o herpesvírus bovino dois (BoHV 2). A técnica foi desenvolvida em placa de 96 cavidades e sendo testada somente uma diluição (1:4) do

soro. Para isto, misturava-se amostras de soro (25µL), meio de cultivo (25µL) e vírus (50µL) e incubava-se durante duas horas à 37° C. As amostras foram testadas em duplicata e todas as placas tinham soro controle positivo, negativo e controle do cultivo celular. A quantidade de vírus utilizada em cada poço era de aproximadamente 100 TCID₅₀ (*tissue culture infection dose*). A diluição do vírus foi calculada com base no título de uma amostra viral estoque.

Após o período de incubação de 2hrs, células CRIB foram adicionadas e as placas foram incubadas em estufa a 37° C contendo 5% de CO₂. A leitura final do teste era feita com 96 horas. Inicialmente, o controle de células e as amostras positivas e negativas eram conferidas. Após verificar esses poços e o teste validado, então era feita a leitura dos poços que continham as amostras suspeitas. Os poços que apresentassem ECP significava que não havia a presença de anticorpos neutralizantes para o vírus, portanto, o animal era soronegativo. Já os poços que apresentassem o tapete celular íntegro, ou seja, sem ECP, significava que havia anticorpos capazes de neutralizar o vírus, e o animal era considerado soropositivo. A figura 5 demonstra a presença ou ausência de ECP, indicando um animal negativo e positivo, respectivamente.

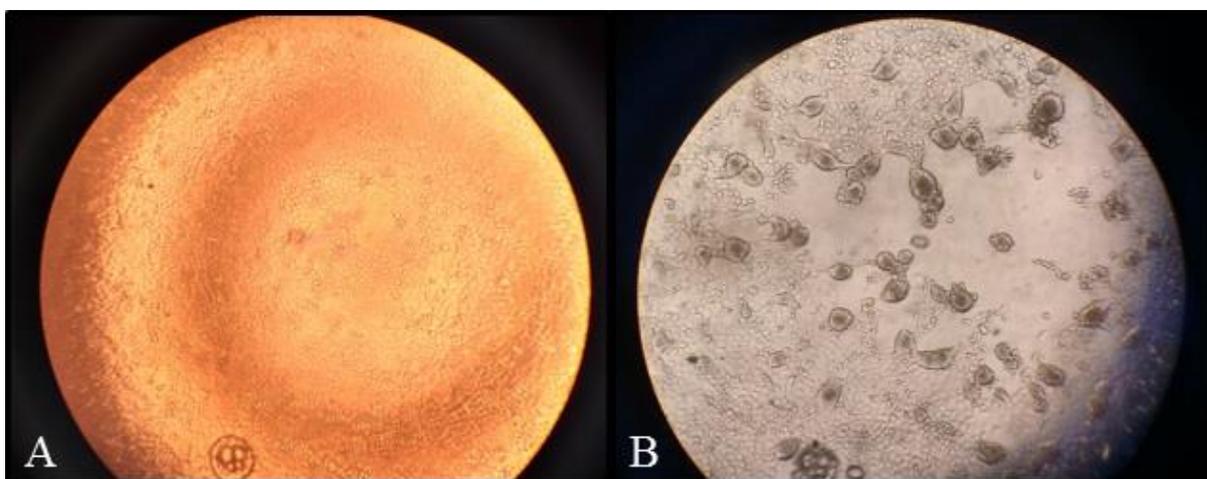


FIGURA 5- Técnica de Soroneutralização para herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV 2). Amostras testes de animais soropositivos para BoHV 2 (A) e soronegativos (B).

2.2.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica de biologia molecular capaz de detectar pequenas quantidades de ácidos nucleicos presentes em amostras. Os ácidos nucleicos dos vírus encontram-se nos tecidos infectados, fluidos corporais, secreções e excreções uma vez que são produtos da

multiplicação viral (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Essa é uma técnica preferencial para diagnóstico devido sua versatilidade, sensibilidade e especificidade (BRUM & WEIBLEN, 2012).

No LGSA da Embrapa Suínos e Aves, esta técnica é utilizada na triagem de amostras com suspeita de infecção viral. A partir do resultado positivo eram realizados outros procedimentos como o isolamento viral em cultivo celular e/ou em ovos SPF, teste de hemaglutinação. O tipo de PCR dependia da suspeita, podendo ser PCR convencional para detecção de vírus com genoma composto por DNA ou RT-PCR para detecção de vírus com genoma RNA.

2.2.10.1 PCR convencional

Durante o estágio acompanhou-se a realização da técnica para detecção do DNA do circovírus suíno tipo 2 (PCV 2). A PCR foi realizada com o auxílio de equipamento denominado termociclador, responsável por promover variações cíclicas de temperaturas e tempo com objetivo de amplificar uma parte do genoma. Para isso, foi preparado um *mix* de reagentes (Invitrogen®) contendo tampão da enzima (*buffer*), deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), cloreto de magnésio, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e Taq DNA polimerase, além do DNA extraído do material suspeito e água livre de RNases e DNases (completar o volume final). Anteriormente à realização da técnica, o DNA foi extraído das amostras suspeitas utilizando-se o *kit* DNeasy (QIAGEN®), contendo os reagentes necessários para o procedimento.

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose, submetido à 80V por pelo menos uma hora e meia. O gel de agarose 1% foi preparado em 30 ou 100mL de Tris-Borato EDTA (TBE) dependendo do número de amostras. A solução foi colocada no micro-ondas para solubilizar, e homogeneizada a cada minuto. Posteriormente, foi adicionado brometo de etídio e colocado na cuba para solidificar. O brometo de etídio auxilia a visualização dos fragmentos de DNA amplificado.

Posteriormente, as amostras foram misturadas com azul de bromofenol e depositadas nos orifícios contidos no gel. O azul de bromofenol facilita a localização das amostras do gel durante a eletroforese. Como guia para identificar os fragmentos de DNA amplificados (em pares de base), foi utilizado um marcador de peso molecular, contendo fragmentos de DNA

de peso molecular reconhecido. Após a realização da eletroforese, o gel foi colocado no transiluminador com uma lâmpada UV e os resultados analisados.

2.2.10.2 Transcrição reversa seguida de PCR

A RT-PCR era utilizada para detecção de vírus com genoma RNA, como o vírus da influenza suína e o senecavírus. O procedimento de RT-PCR é igual ao da PCR convencional, apenas acrescentando uma etapa inicial para transcrição reversa do RNA ou síntese de cDNA, (DNA complementar) e, a partir daí, é realizada a PCR.

A extração do RNA das amostras foi feita em um equipamento denominado *MagMAX Express Particle*. Para isto foi utilizado o kit *MagMAX Viral RNA Isolation* (Ambion®), esse equipamento era programado e realizava todo o procedimento de extração do material genético de forma automática.

Para a transcrição reversa foi preparado um mix utilizando o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). O kit continha o tampão da enzima, dNTPs, *primer* Uni12 (influenza) ou *primer* randômico 10X (Senecavírus), enzima (*Multiscribe Reverse Transcriptase*), inibidor ribonuclease, água e o RNA extraído da amostra. O procedimento de transcrição também era realizado no termociclador. As condições da reação eram aquecimento inicial (25° C/10min), síntese de RNA (37° C/120min) e denaturação (85° C/5min). Após o término desta reação, o produto resultante denominado cDNA, utilizado como *template* (DNA) em uma reação de PCR convencional. Essa nova reação utilizava os mesmos reagentes descritos anteriormente e utilizava *primers* específicos para o agente viral em questão. Após a finalização do teste, as amostras eram resolvidas por eletroforese em gel de agarose e a leitura feita com auxílio do transiluminador, da mesma forma descrita como na PCR convencional.

2.2.11 Diagnóstico

A realização do diagnóstico laboratorial vai além de dar suporte à investigação clínica e pode ser essencial para a certificação de animais livres de infecções (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Muitas vezes as infecções víricas apresentam sinais inespecíficos ou até mesmo não apresentam sinais clínicos, tornando a confirmação laboratorial necessária (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Portanto, é importante certificar-se de que o material a ser enviado, deve estar em condições mínimas para processamento. Ou seja, escolher corretamente o material a ser coletado conforme a suspeita, acondicionar adequadamente para uma boa conservação da amostra, além de enviar um histórico contendo as informações mínimas como o tipo de amostra, a espécie do animal, a suspeita clínica, lesões e informações epidemiológicas (FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

Durante o estágio foi possível acompanhar o recebimento das amostras e observar as condições em que eram enviadas ao laboratório. O SV da UFSM é referência para diagnóstico de algumas infecções víricas, recebendo assim amostras de diversas regiões do Brasil, principalmente da região sul do país, como Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Para o recebimento das amostras, o SV tem um bolsista responsável em receber as amostras, conferir o requerimento e prepará-las para serem processadas. Caso as amostras sejam impróprias para o diagnóstico, essas são recusadas, e o veterinário responsável é notificado. Quando estão de acordo com os pré-requisitos mínimos (volume, aspecto e conservação), as amostras são protocoladas, recebendo um número de identificação. Juntamente são registrados os dados do proprietário, médico veterinário e um breve histórico do caso em um livro e em um sistema informatizado do laboratório. Dependendo do tipo, as amostras são centrifugadas, aliqüotadas e inativadas em banho-maria a 56° C. Essas eram armazenadas até serem processadas para a técnica solicitada. Quando era solicitado pelo proprietário ou médico veterinário, as amostras também eram enviadas aos laboratórios de doenças parasitárias e laboratório de Leptospiroses. Durante o período de estágio, observou-se que em muitos casos as amostras apresentavam problemas de coleta e acondicionamento, mesmo sendo elas coletadas por veterinários.

Em um período de dois meses de estágio, foi possível quantificar o número de amostras que chegaram para diagnóstico, e analisar qual espécie foi mais frequente e qual suspeita teve maior ocorrência, além de quantificar o resultado dessas amostras. Essas informações estão descritas na Tabela a seguir.

TABELA 3- Solicitações de diagnóstico virológico e/ou produção de vacina autógena submetidas ao Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, durante o período de 14 de março a 20 de maio de 2016.

Espécie	Suspeita	Amostra	Número	Resultado	
				Positivo	Negativo
Bovino	IBR	Soro	558	213	137
	BVD	Soro	558	176	174
	Raiva	SNC	14	7	7
	BLV	Soro	40	23	17
	Papiloma	Lesão	7		
Equino	Herpesvírus	Soro	23	-*	-
Ovino	BTV	Órgãos	5	2	3
Canino	CDV	Urina/ Líquor	6	-	3
	CPV	Órgãos/ fezes	8	1	-
	Papiloma	Lesão	1	-	-
Felino	Raiva	SNC	1	-	-
TOTAL			1.221	422	341

*Amostras em processamento e sem diagnóstico final até o momento da finalização do estágio.

As amostras positivas e negativas para IBR e BVDV, ao soma-las não atingem o número total de amostras recebidas pois até o final do estágio algumas amostras estavam sendo processadas.

Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), leucose enzoótica bovina (BLV), vírus da língua azul (BTV), vírus da cinomose canina (CDV), vírus da parvovirose canina (CPV).

2.2.12 Processamento de tecidos para isolamento

Por se tratarem de microrganismos intracelulares obrigatórios, os vírus necessitam de células vivas para se multiplicar, sendo que a maioria não tem a capacidade de permanecer viável no meio ambiente por muito tempo (FLORES & TRAESEL, 2012). Assim quando o vírus encontra um hospedeiro suscetível, infecta pela via adequada e dissemina-se até algum órgão alvo para se multiplicar, produzindo sua progênie. Após a sua multiplicação no hospedeiro, os vírus são excretados, dando continuidade ao seu ciclo (FLORES & TRAESEL, 2012). Portanto, os tecidos e órgãos devem ser priorizados para diagnóstico, aumentando as chances de detecção do agente. E para isso, é importante o processamento do material, para que haja lise celular e liberação do vírus intracelular.

No estágio foi acompanhado o processamento de tecidos para diagnóstico, provenientes de empresa privada, de laboratório parceiro como é o caso do Centro de

Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA) e dos animais pertencentes a EMBRAPA. O material encaminhado para o LSGA seguia um protocolo, onde, na recepção, era cadastrado gerando um número de registro contendo informações sobre a amostra. Esse número servia para identificar a amostras durante todo o processamento.

O material colhido de suínos era processado em uma cabine de fluxo laminar, retirando uma pequena porção do tecido (cerca de dois centímetros), preferencialmente de área com lesão, e colocado em macerador de tecidos do tipo *tenbroek*. A seguir, era adicionado 10 mL de meio de infecção contendo meio essencial mínimo (MEM), albumina sérica bovina (BSA), tripsina e solução de antibióticos e o tecido macerado. Após, o homogenizado era centrifugado a 3000 rpm, a 4°C por cinco minutos. O sobrenadante era coletado e aliqotado em diversos microtubos, para ser utilizado para isolamento viral, PCR ou armazenado como estoque. As amostras eram armazenadas em freezer -80° C até a sua utilização. Pequenos fragmentos do tecido original também eram estocados em placas de Petri.

2.2.13 Produção de vacina para papilomatose

Existem dois tipos de vacina para papilomavírus, sendo as vacinas profiláticas e as vacinas terapêuticas. O tipo terapêutico auxilia na regressão de lesões já estabelecidas, havendo experimentos controlados que confirmam o efeito positivo de vacinas autógenas na regressão da lesão (ALFIERI et al. 2012).

Foi possível acompanhar a produção de vacinas autógenas no SV, que devem ser administradas como três doses de 15 mL em intervalos de 21 dias entre as aplicações. Para a produção da vacina autógena são necessários 4,5g de papiloma (tecido vivo). As amostras de tecido foram lavadas em água corrente e maceradas com auxílio de areia estéril. Após a maceração adicionou-se 45mL de solução de HANKS, 4,5mL de clorofórmio e congelou-se esta mistura em - 20°C *overnight*. No dia seguinte o material foi descongelado e agitado por 30 min no *shaker*. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado (4000rpm/15 min), o sobrenadante coletado em um frasco estéril. Após, adicionou-se 0,5mL de formol a 1% e 1% de penicilina. A vacina era aliqotada em frascos de 45mL (volume das três doses/animal) e uma amostra era submetido ao exame bacteriológico. Após o resultado do exame negativo, a vacina era liberada para utilização.

3- DISCUSSÃO

3.1 Influenza suína

No quesito exportações, o Brasil atingiu o quarto lugar no ranking de exportador e produtor de carne suína (RYNGELBLUM, 2015). Dado o atual cenário de crescimento da cadeia da carne suína, a sanidade é um importante quesito, sendo ela um dos fatores que controlam a oferta do produto no mercado, tanto externo como interno. As granjas produtoras de suínos confrontam diariamente doenças que podem afetar a produção, sendo essas de causas multifatoriais (MORÉS, 2011). Dentre as doenças que afetam a cadeia suína, destacam-se as que mais ocorrem no sistema de produção e que causam grandes perdas econômicas, as doenças que são mantidas controladas e as doenças de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) (MAPA,2013). Entre essas, destaca-se a influenza suína, como importante fator que afeta a produção de suínos.

A influenza suína é uma doença respiratória causada por um vírus RNA pertencente à família *Orthomyxoviridae*, caracterizado pela capacidade de infectar as células através do muco, por isso o nome, *myxo* significa muco e *ortho* significa verdadeiro (MORI et al. 2012). Esse vírus é um dos principais problemas da saúde pública, pois são capazes de infectar humanos e animais, sendo uma grande causa de perdas econômicas em animais de produção. Seu genoma segmentado confere condições para a ocorrência de rearranjos gênicos entre diferentes vírus, também denominado reassortimento, dando origem a vírus novos. Além dessa característica, esses vírus apresentam alta variabilidade antigênica das glicoproteínas de superfície, favorecendo a ocorrência de mutação e seleção de variantes. Essa característica possibilita a manutenção do vírus circulando na população, pois a resposta imune não é capaz de neutralizar totalmente os vírus originário da recombinação (MORI et al. 2012).

A família da qual os vírus influenza fazem parte, segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV* (2014), é dividida em seis gêneros: *Influenzavirus A*, *B*, *C*, *Isavirus*, *Quaranjavirus* e *Thogotovirus* sendo que os *Influenzavirus A* são capazes de infectar aves e mamíferos, incluindo humanos e suínos (SANTOS, 2014). Esse gênero merece maior atenção por apresentar grande variabilidade antigênica, podendo ser dividido em subtipos de acordo com a reatividade sorológica das glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase

(NA), presente no envelope viral. Até hoje foram descritos 16 tipos de HA e nove de NA, proporcionando assim uma gama de subtipos (MORI et al. 2012). Do gênero *Influenzavirus A*, pode-se destacar o vírus da influenza suína (SIV), altamente contagioso e isolado pela primeira vez em suínos em 1930 nos EUA. A partir de 1975, notou-se maior número de sorologia positiva para o vírus influenza em rebanhos suínos e aumento nos casos clínicos, além do aparecimento de novos subtipos do vírus. Atualmente o vírus é considerado endêmico em suínos e os subtipos virais H1N1, H3N2 e H1N2 são os de maior ocorrência (MORI et al. 2012).

A doença causada pelo vírus da influenza suína, por ser uma síndrome respiratória, tem como característica acometer o trato respiratório dos suínos (GAVA, 2015). Ainda sobre a epidemiologia do vírus, segundo Gava (2015), o vírus não infecta outros sistemas e órgãos do suíno e, portanto, não compromete a carcaça do animal na inspeção *post-mortem*, sendo seguro o consumo da carne para humanos. Em contrapartida, de acordo com Mori et al. (2012), a doença causada pelo vírus gera um impacto econômico na produção de suínos devido ao atraso no desenvolvimento e, conseqüentemente, um período maior de alojamento e manutenção dos animais nas granjas.

A carne suína tem ganhado espaço na mesa do consumidor, uma vez que tem passado por melhoramento genético. Esse melhoramento busca reduzir defeitos congênitos com foco também na redução da gordura. Assim, a carne tornou-se mais saborosa e nutritiva (ABCS, 2016), quebrando mais um preconceito. Porém, em 2009, com a pandemia de influenza em humanos denominada erroneamente de gripe suína, o mercado consumidor mais uma vez diminuiu o consumo, proporcionando uma pequena queda no mercado da carne suína (APS, 2016). Por ser uma zoonose (MORI et al. 2012), a influenza suína impactou a cadeia de criação dos suínos, refletindo tanto no mercado consumidor quanto na criação de suínos.

Durante o estágio, alguns suínos do plantel apresentaram sinais clínicos de tosse, que, segundo Flores (2012), é um sinal clínico da doença que acomete o trato respiratório, além de ser descrito outros sinais como febre, anorexia, secreção nasal, conjuntivite e inflamação no pulmão. O vírus da influenza suína tem como característica a replicação nas células epiteliais do trato respiratório, já demonstrado na mucosa nasal, tonsilas, traqueia, linfonodos traqueobronquiais e pulmões (MORI, et al. 2012). De um modo geral, indica-se fazer a coleta de secreções nasais e órgãos afetados pela patologia, havendo maior probabilidade de detectar o agente ou seus produtos (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). De acordo com Schaefer et al. (2013), as amostras de secreção nasal, pulmão e fluído oral são indicadas para teste virológico e molecular. Para o diagnóstico anátomo-histopatológico e imunohistoquímica,

utiliza-se pulmão, e para sorologia são colhidos sangue (soro) e fluído oral. Apesar da traqueia também ser um sítio de replicação viral, é pouco utilizada no diagnóstico de rotina de influenza (SCHAEFER et al. 2013).

Nos animais sintomáticos pertencentes à granja da Embrapa e acompanhados durante o estágio, foram realizadas coletas da secreção nasal de animais. No total, foram coletados cinco animais, três pertencentes à creche e os dois restantes à terminação. Segundo Flores (2012), os órgãos e sistemas, em específico o pulmão, são indicados para diagnóstico, porém são somente viáveis para animais que foram necropsiados. Em animais vivos, a secreção nasal é indicada para diagnosticar influenza (SCHAEFER, 2013). Apesar de amostras de secreção nasal serem mais indicadas para o diagnóstico da influenza, Detmer (2011) demonstrou que o vírus também pode ser detectado em amostras de fluido oral.

Para a realização da coleta, o suíno foi contido, o *swab* foi introduzido em uma narina e realizado movimentos circulares, de maneira que percorresse todo o espaço dos cornetos possível, e com o mesmo *swab* foi realizado novamente o procedimento na outra narina, como indica Schaefer et al. (2013). Segundo Flores & Cargnelutti (2012), o *swab* deve ser coletado de forma profunda e agressiva, aumentando a chance de coletar o vírus e/ou células descamativas. Porém de acordo com Schaefer et al. (2013), nos casos específicos de influenza suína, a profundidade da coleta depende da idade do animal (em geral, de 3-10cm), sendo que a introdução do *swab* não deve oferecer resistência, e preferencialmente não deve conter sangue na amostra coletada.

As amostras coletadas foram transportadas em meio de transporte próprio para vírus, e mantidos em caixas térmicas com gelo para manter as amostras sob temperatura controlada e assim, melhor conservá-las. Para manter a qualidade da amostra, além da temperatura, o indicado, segundo Schaefer et al. (2013), é a utilização de meios de cultura ou solução salina de fosfato (PBS), suplementado com antibiótico e BSA. Ainda segundo Flores & Cargnelutti (2012), a solução fisiológica estéril também pode ser utilizada.

No LSGA, após o recebimento da amostra, esta é primeiramente registrada seguindo um protocolo de rotina e posteriormente processada. Como a amostra de secreção nasal é colhida através de *swab* nasal, o processamento é simples e rápido. As amostras coletadas nos tubos contendo o meio de transporte foram colocadas em um microagitador do tipo *vortex* e o sobrenadante foi alíquotado em microtubos.

Segundo Schaefer et al. (2013), os achados clínico-patológicos são considerados diagnóstico presuntivo, sendo necessária a realização de análise laboratorial para o diagnóstico definitivo. Os testes mais utilizados para diagnóstico de influenza incluem

isolamento viral, testes sorológicos para demonstração de anticorpos, testes moleculares para detecção do material genético e histopatológico para visualização das lesões microscópicas (SCHAEFER, 2013). As amostras coletadas foram testadas utilizando a técnica de RT-PCR e analisadas em eletroforese, sendo todas negativas para influenza suína.

O resultado negativo implica apenas que a amostra era negativa para influenza A, portanto, não se pode afirmar que os animais não tiveram contato com o vírus e que não desenvolveram a doença. Um dos principais fatores que podem estar envolvidos na não detecção do agente é o período da coleta, sugere-se realizar a coleta em torno de 24 à 48 horas pós surgimento dos sinais clínicos (OIE, 2009). Entretanto, segundo Schaefer et al. (2013), o vírus somente é excretado durante a fase aguda da infecção, entre 24 horas a 6-8 dias pós-infecção, sendo esse o período indicado para realizar a coleta de material.

Em casos de resultados positivos no teste de RT-PCR, a amostra era submetida a técnica de isolamento viral, pois a RT-PCR detecta o material genético viral ou até mesmo fragmentos deste (FLORES, 2012), não assegurando que o vírus está viável. A inoculação da amostra em ovos embrionados ou em células de linhagem permite avaliar a viabilidade do vírus quando o mesmo é isolado. De acordo com Silveira (2011), como procedimento padrão, as amostras são inoculadas em células da linhagem *Madin-Darby canine kidney* (MDCK), no entanto, quando não é possível isolar o vírus em cultivo celular a amostra é então submetida a técnica de inoculação em ovos embrionados.

Assim sendo, observou-se a importância em manter a influenza suína controlada, pois é uma infecção endêmica na maioria dos países produtores (MORI et al. 2012), mesmo que não faça parte das doenças reguladas pelo programa sanitário nacional (MAPA, 2009). A maneira para se controlar a disseminação do vírus, implica na adoção de medidas de biosseguridade. No caso de suspeita da doença, os animais devem ser observados, amostras devem ser colhidas e enviadas a laboratórios de diagnóstico e identificação da presença viral, auxiliando no monitoramento de novas variantes antigênicas circulantes.

3.2 Cinomose canina

A cinomose canina é uma doença causada por um vírus pertencente à família *Paramyxoviridae*, com genoma RNA, de fita simples e não segmentado. Essa família é constituída de importantes agentes do trato respiratório tanto de humanos quanto animais

(ARNS et al. 2012). A família é dividida em sete gêneros, sendo, segundo o ICTV (2015), *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* e *Rubulavirus*. Esses vírus apresentam uma variedade de hospedeiros, seja por infecção natural ou experimental, podendo ocasionar desde infecções assintomáticas, de relevância clínica ou até infecções fatais (ARNS et al. 2012). Algumas doenças causadas por vírus pertencente a essa família, são de grande significância para a medicina veterinária, seja pelo aspecto econômico em animais de produção ou pela sua prevalência na população. Dentre os paramixovírus mais relevantes, pode-se citar o vírus da parainfluenza, vírus da peste bovina, vírus respiratório sincicial bovino, vírus da cinomose canina e vírus da doença de *Newcastle* (ARNS et al. 2012). Ainda, o vírus da peste bovina foi o primeiro agente infeccioso de animais que foi erradicado do mundo (ROEDES et al. 2013)

Dentre os sete gêneros, ressalta-se o *Morbillivirus*, no qual está classificado o vírus da cinomose canina (CDV). Apesar de infectar mamíferos das famílias *Felidae*, *Mustelidae* e *Procyonidae* (leões, furões e guaxinins, respectivamente) os hospedeiros naturais são os canídeos domésticos e selvagens. A importância desse vírus está diretamente relacionada às manifestações clínicas em cães domésticos (ARNS et al. 2012). Sobretudo, o CDV apresenta-se antigênica e morfológicamente semelhante ao vírus da peste bovina e ao sarampo humano (DIAS et al. 2012).

A principal forma de transmissão do CDV é pelo contato direto, com secreções orais, nasais e urina de animais infectados. Dessa maneira, o vírus replica primeiramente no epitélio e em macrófagos do trato respiratório superior, podendo assim atingir os linfonodos regionais (ARNS et al. 2012). Após esse estágio, aqueles animais que não desenvolvem uma resposta imune eficiente estão sujeitos a diferentes níveis de severidade da doença. No segundo estágio da infecção, o vírus faz viremia e dissemina-se para a pele e trato respiratório, nervoso, digestório e urogenital (ARNS et al. 2012). Os sinais clínicos da doença podem variar desde apatia, secreções nasal e ocular serosa, imunossupressão, pústulas abdominais na pele, hiperqueratose do focinho e coxins e diarreias em fase aguda. Até infecções mais severas, em forma crônica progressiva, como encefalites e desmielinização (ARNS et al. 2012).

O diagnóstico clínico da doença é sugestivo, principalmente quando o animal jovem apresenta sinais respiratórios, respiratórios, lesões cutâneas, associados ou não com sinais neurológicos (ARNS et al. 2012; MORES et al. 2013). Devido a esses sinais não específicos, apesar de sugestivos, é necessário a realização do diagnóstico laboratorial para confirmar a doença causada pelo CDV. Segundo Arns et al. (2012), o diagnóstico pode ser feito através de esfregaço sanguíneo, IFA e imunoperoxidase (IPX). Ainda existe a possibilidade de

complementar o diagnóstico com histopatológico, isolamento, imunohistoquímica, soroneutralização, ELISA e métodos moleculares (MORES et al. 2013). Atualmente, de acordo com Flores & Cargnelutti (2012), para a detecção do antígeno por meio de teste rápido, pode-se citar testes imunocromatográficos. Apesar do isolamento ser citado como uma forma de diagnóstico, é uma técnica pouco utilizada devido a necessidade que o vírus da cinomose tem em se adaptar ao cultivo celular, sendo necessário várias passagens e demandando tempo (ARNS et al. 2012).

A coleta de material para diagnóstico depende do estágio da doença no animal e se o diagnóstico é *ante mortem* ou *post mortem*. O principal fator para detecção do antígeno é a coleta no período de replicação viral, ou seja, quando o animal apresenta sintomatologia clínica (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Quanto a escolha do material a ser coletado, prioriza-se amostras do sítio de replicação do vírus, e, segundo Arns et al. (2012), as amostras para diagnóstico de cinomose são secreções nasal e ocular, líquido cefalorraquidiano e urina. De acordo com Flores & Cargnelutti (2012), as chances de detectar os agentes e seus produtos aumentam quando o diagnóstico é feito a partir de sistemas e órgãos afetados, porém só são viáveis para diagnóstico *post mortem*.

Durante o período de estágio, duas amostras de cães, um de cinco anos e o outro de oito anos de idade, chegaram para diagnóstico de cinomose canina no SV/UFSM. Esses animais foram encaminhados ao setor de neurologia do hospital veterinário da universidade, com sinais neurológicos, e para diagnóstico diferencial foi indicado realizar teste para cinomose canina. O teste de eleição, no SV/UFSM, para CDV é imunocromatografia. Apesar de existirem outras técnicas como forma de diagnóstico citadas por Arns et al. (2012), a imunocromatografia tem ganhado espaço na clínica, pois além de ser simples e rápido de realizar, são considerados sensíveis e de alta especificidade (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). As amostras dos animais suspeitos encaminhadas ao laboratório foi líquido. E estas foram submetidas ao teste imunocromatográfico *Megacor Fastest® Distemper Strip* (Austria) para detecção de antígeno. No entanto, resultado do teste em ambos os casos, foi negativo. Ainda, secreção nasal, ocular e urina também são opções para a realização deste tipo de teste (FLORES & CARGNELUTTI, 2012; ARNS et al. 2012) e não pode-se descartar que com as estas amostras os animais teriam um resultado diferente.

Apesar de já existir *kits* imunocromatográficos para detecção de anticorpo, o utilizado para realização do diagnóstico detecta antígeno específico para cinomose canina (MEGACOR, 2013). O resultado do teste ser negativo não implica que os sinais clínicos do animal não possa ter correlação com uma infecção passada, apenas demonstra que não foi

detectado antígeno naquela amostra. De acordo com Arns et al. (2012) e Dias et al. (2012), na maioria dos casos, a sintomatologia neurológica, apesar de poder ocorrer no início da infecção, é reflexo da recuperação de uma infecção aguda, permanecendo como sequela no paciente. Porém, segundo Mores et al. (2013), em alguns casos, o vírus pode persistir nos tecidos nervosos e ocasionar sinais neurológicos tardios, como a encefalite, mais conhecida encefalite do cão idoso. Nos casos em que o vírus persiste no animal após atingir o SNC, segundo Beineke et al. (2009), apresenta baixa replicação dificultando a detecção em amostras do líquido cefalorraquidiano. Uma outra hipótese para o teste ter sido negativo, é que, de acordo com Bollo et al. (1986), cães que apresentam uma resposta imune eficiente, diminuem as chances de persistência do vírus. Ou seja, no estudo realizado, 47% dos animais que apresentavam lesões neurológicas pelo CDV não tiveram o vírus detectado, pois comprovadamente, a resposta imune contra o vírus lesionou o tecido nervoso. Nessa situação a lesão no SNC promove uma imunopatologia, contribuindo para os sinais neurológicos (BOLLO et al. 1986).

Ao considerar a semelhança dos sinais clínicos, causados pelo CDV, com outras doenças, observa-se a importância do diagnóstico laboratorial. Como diagnóstico diferencial, pode-se citar parvovirose, raiva, intoxicação por chumbo, hipocalcemia, traqueobronquite infecciosa canina e erliquiose (MORES et al. 2013). A cinomose canina é enzoótica no mundo (ARNS et al. 2012), e, a situação do Brasil é considerada endêmica (BUDASZEWSKI et al. 2014). No Brasil, a maioria da população de cães é considerada errante ou de donos com baixa renda e, portanto, esses animais não são vacinados (BUDASZEWSKI et al. 2014). Estudos realizados e relatos de casos revelam a presença do vírus nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso (BUDASZEWSKI et al. 2014); Maranhão (BRITO et al. 2016) e Goiás (FREITAS-FILHO et al. 2014); demonstrando que o CDV está difundido entre os estados do país. Diante dos fatos e da situação da cinomose canina apontada, reforça ainda mais a importância para a confirmação com auxílio de testes laboratoriais de casos suspeitos.

3.3 Mamilite herpética

A mamilite herpética é uma doença conhecida por lesionar tetos e úbere, e por isso acarreta em grande impacto na produção leiteira (FRANCO et al. 2012). O herpesvírus bovino

2 (BoHV 2) é o agente responsável por essa infecção, pertence à família *Herpesviridae*. Os herpesvírus possuem genoma DNA de fita dupla linear, capsídeo icosaédrico e envolto por um envelope lipoproteico. Essa família é dividida em três subfamílias, sendo *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* e *Gammaherpesviridae*, e possuem cinco, quatro e quatro gêneros, respectivamente (ICVT, 2015).

Além da infecção produtiva, com a produção de partículas viáveis, os vírus dessa família são caracterizados pela capacidade de produzir latência, ou seja, não há replicação viral mesmo o animal estando infectado (FRANCO et al. 2012). Durante a latência, o genoma do vírus permanece alojado na forma episomal em células neuronais, sem produzir progênie e como consequência não há manifestação de sinal clínico qualquer. A infecção latente pode ser reativada em quadros de estresse, ocorrendo replicação lítica nos neurônios e transportando-se para o sítio de replicação inicial e assim produzindo progênie viral (FRANCO et al. 2012). Esses animais latentemente infectados podem ser identificados no rebanho através da sorologia. Sendo um diagnóstico importante, uma vez que esses animais são considerados fonte de infecção ao rebanho (FRANCO et al. 2012).

Durante o estágio foram testadas amostras de soro bovino com o objetivo de detectar anticorpos para BoHV 2 e assim conhecer a situação de diferentes rebanhos do Rio Grande do Sul. As amostras testadas haviam sido encaminhadas ao SV com suspeita de diarreia viral bovina (BVDV) e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). Estas foram testadas através da técnica de soroneutralização, pela qual testou-se 48 propriedades, sendo um total de 210 bovinos. Desses, 38 soros foram positivos, ou seja, apresentaram anticorpos contra BoHV 2, e 33 amostras demonstraram-se tóxicos para a cultura celular. Assim, pode-se concluir que 18% das amostras testadas foram positivas, indicando que o vírus circula nas propriedades e muitas vezes não é notado. Outros estudos demonstram prevalências semelhantes como no sudeste do Rio Grande do Sul com 19,7%, e outras mais elevadas como a região noroeste com 48,2% (TORRES et al. 2009).

Mesmo não havendo muitos estudos científicos no Brasil sobre esse vírus, e existir diversas dúvidas com relação a sua transmissão (FRANCO et al. 2012), a infecção encontra-se presente nos rebanhos brasileiro e de outros países (TORRES et al. 2009). Apesar de Torres et al. (2009) abordarem relatos de veterinários sobre manifestações clínicas de mamilite compatíveis com BoHV 2, diagnóstico laboratorial da infecção raramente é realizado (Franco et al. 2012). No entanto, a detecção de anticorpos neutralizantes específicos para o BoHV 2 comprovam a sua circulação entre os bovinos. Outro fator que corrobora para

a não detecção é a doença ser auto-limitante, e quando não há severidade da lesão, acaba sendo de curso clínico rápido (FRANCO et al. 2012).

A mamilite herpética apresenta importância sanitária (TORRES et al. 2009), impactando principalmente a produção leiteira (FRANCO et al. 2012). Além das lesões causadas pela infecção, pode ocorrer infecções bacterianas, causando mastite crônica (FRANCO et al. 2012). Ainda segundo Franco et al. (2012), essa infecção pode refletir em até 20% de perda na produção leiteira e acarretar em descarte de animais. Franco et al. (2012) sugere que a ocorrência dessa infecção é maior em gado leiteiro do que gado de corte devido as condições de manejo e estresse que os animais são submetidos. Estas condições de manejos são confirmadas por Torres et al. (2009), citando a aglomeração dos animais e principalmente as práticas de manejo durante a ordenha. Torres et al. (2009) ainda cita estas condições podendo favorecer a disseminação do vírus entre os animais do rebanho.

4- CONCLUSÃO

Na Embrapa Suínos e Aves foram desenvolvidas atividades com influenza vírus suíno, senecavírus A e circovírus suíno 2. Estes são importantes viroses que acometem a suinicultura do Brasil, sendo que o senecavírus é um vírus emergente nos rebanhos nacionais. A realização do estágio em dois locais, permitiu observar uma mesma técnica ser executada de formas diferentes, como foi o caso de cultivo celular. A diferença na execução está relacionada à formação e adaptação das condições dos laboratórios. E, independente da técnica escolhida, é essencial o seu conhecimento básico para sua execução e sucesso no diagnóstico laboratorial.

Uma das observações realizadas foi com relação as amostras encaminhadas à Embrapa Suínos e Aves. Estas provinham de agroindústrias e apresentavam uma melhor qualidade de coleta e armazenamento. Já no SV as amostras eram encaminhadas por veterinários de campo, e uma parcela considerável destas apresentavam problema de coleta, armazenamento ou transporte, comprometendo o diagnóstico. Diante disso, apesar da importância do diagnóstico virológico estar difundida tanto na literatura quanto na rotina, ainda existem pontos a serem melhorados. Os veterinários de campo necessitam melhorar tanto a coleta quanto o armazenamento e estabelecer maior contato com os laboratórios.

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, além de agregar conhecimento e experiência, possibilitou o contato com realidades diferentes, com situações de mercado de trabalho e com outros profissionais da área. O ECSMV, como etapa de formação acadêmica, possibilita ao graduando exercer os ensinamentos práticos e teóricos adquiridos ao longo da formação acadêmica.

REFERÊNCIAS

ABCS. **Evolução genética**, 2016. Disponível em: <<http://www.abcs.org.br/producao/genetica/174-evolucao-genetica>>. Acesso em 26 jan. 2016.

ALFIERI, A.A, LUNARDI, M, ALFIERI, A.F. Papilomarividae. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, p 475-476, 2012.

ARNS, C.W. et al. Paramyxoviridae In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, p. 761-780, 2012.

BEINEKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.127, p.1-18, 2009.

BOLLO, E. et al. Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination, **Acta Neuropathol**, Berlim, v.72, p.69-73, 1986.

BRITO, L.B.S, et al. Aspectos epidemiológicos da cinomose em cães atendidos em um Hospital Veterinário no período de 2011 a 2013, **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.10, n.7, Jul. 2016.

BRUM, M.C.S e WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, 2012.

BUDASZEWSKI, R. F, et al. Genotyping of canine distemper vírus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012, **Virus Research**, v.180, p.76-83, 2014.

DIAS, M.B.M.C. et al. Cinomose canina: revisão de literatura, **Medicina Veterinária**, v.6, n.4, p.32-40, 2012.

DETMER, S.E. et al. Detecion of influenza A vírus in porcine oral fluid samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. n. 23, p. 241-247, 2011.

DMVP, **Setor de Virologia**, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, 2004.
Disponível em:
<<http://jararaca.ufsm.br/websites/departamen/79671e96dca2a6b5795649ddb820b58f.htm>>.
Acesso em: 29 mar. 2016.

EMBRAPA. **Embrapa Suínos e Aves: História**, 2016. Disponível em:
<<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/historia>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

FLORES, E.F (org). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2ed, Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2012.

FLORES, E.F.; CARGNELUTTI, J.F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM. p. 333- 360, 2012.

FLORES, E.F.; TRAESEL, C.K. Epidemiologia das infecções víricas. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM. p. 300- 301, 2012.

FRANCO, S.C, ROEHE, P.M, VARELA, A.P.M. Herpesviridae. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, 2012.

FREITAS-FILHO, E.G, et al. **Prevalência, fatores de risco e associações laboratoriais para cinomose canina em Jatai-GO**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.10, n.18, p.2356, 2014.

GAVA, D. **Suinocast: Influenza na Suinocultura Brasileira, Suinocultura Industrial**, 2015. Disponível em: http://www.suinoculturaindustrial.com.br/noticia/suinocast-influenza-na-suinocultura-brasileira/20150505083347_H_086>. Acesso em: 11 mar. 2016.

ICB. **Departamento de Microbiologia: Cultura de Células**, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2016. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/mic/diaadia>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2014 Release**, 2014. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>> Acesso em: 27 mar. 2016.

_____. **Virus Taxonomy: 2015 realease**, International Committe on Taxonomy of Viruses, 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>>. Acesso em: 27 mai. 2016.

MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Suídea**. In: MAPA. Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2016.

_____. **Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013**, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual%20SIZ/IN_50_24_set_13_Lista_doenca_notifica%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em 29 jan. 2016.

_____. **Suínos**, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

MEGACOR. **Fastest® DISTEMPER Strip**, 2013. Disponível em: <http://www.vpdiagnostico.com.br/v1/images/pdf/fast_test_distemper_strip.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2016.

MORES, F.C. et al. Diagnóstico e controle da cinomose caninas, **Publicação em Medicina Veteronária e Zootecnia**, Londrina, v.7, n.14, ed. 237, art. 1566, Julho, 2013.

MORÉS, N. **Perfil sanitário da suinocultura no Brasil, Suinocultura**, 2011. Disponível em: <https://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/doenca-de-suinos-t374/165-p0.htm#=_>. Acesso em: 28 jan. 2016.

MORI, E.; FERREIRA, H.L e FLORES, E.F. Orthomyxoviridae. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, p. 833- 857, 2012.

MARTINS, A.K.A. Técnicas básicas em Cultura de Células. In: CURI, Carmem Maldonado Peres Rui (org). **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: editor Guanabara Koogan S.A., 2005.

OIE. **Swine Influenza: Aetiology, Epidemiology, Diagnosis, Prevencion and Control References**, 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_INFLUENZA.pdf>. Acesso em: 2 fev.2016.

PROMED MAIL. **A searchable database available for research on your local system**, 2016. Disponível em: <<http://www.promedmail.org/>>. Acesso em: 28 mai. 2016.

ROEDES, P.; MARINER, J.; KOCK, R. Rinderpest: the veterinary perspective on eradication. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 360(1623):20120139, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3720037/>>. Acesso em: 11 jun. 2016.

RYNGELBLUM, I. **Até 2018, Brasil será 4º maior produtor de suínos**, Canal Rural, 2015. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/suino/ate-2018-brasil-sera-maior-produtor-suinos-57850>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

SANTOS, F.C. et al. Influenza Suína- Aspectos no controle e tratamento desta doença emergente. **Revista científica de Medicina Veterinária**, Ed. FAEF, ano XII, n.23, jul. 2014. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/sYpaEYzsFwdhpRi_2014-8-5-11-34-47.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2016.

SCHAEFER, R. et al. Orientação para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.1, p. 61-73, jan.2013.

SIE. **Histórico UFSM**, Biblioteca Central, Sistema de Informações para o Ensino, 2016. Disponível em: <http://www.santamaria.rs.gov.br/images/campanhas/152anos/ufsm_historico.pdf >. Acesso em: 29 mar. 2016.

SILVA, W.F. **Comparação da viabilidade das células mononucleares totais da medula óssea de suínos em diferentes protocolos de congelamento**. São Paulo. Tese (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo, 2007.

SILVEIRA, S. et al. Comparação entre isolamento viral em ovos embrionados e em células MDCK do vírus Influenza A em suínos. Concórdia, 2011. **5ª Jornada de Iniciação Científica Embrapa- JINC**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/919168/comparacao-entre-isolamento-viral-em-ovos-embrionados-e-em-celulas-mdck-do-virus-influenza-a-em-suinos>>. Acesso em: 2 fev.2016.

SUINOCULTURA INDUSTRIAL. **Ameaças sanitárias aos suínos podem ser evitadas com prevenção estratégica, aponta especialistas da Merial**, 2014. Disponível em: <http://www.suinculturaindustrial.com.br/noticia/ameacas-sanitarias-aos-suinos-podem-ser-evitadas-com-prevencao-estrategica-aponta-especialista-da-merial/20140925094315_n_305>. Acesso em: 29 jan. 2016.

SV/UFSM. **Início, Setor de virologia**, Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, 2015. Disponível em: <https://setordevirologiaufsm.wordpress.com/>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

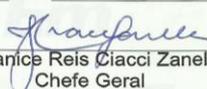
THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cell Culture Basics Handbook**. Thermo Fisher Scientific Inc, Gibco®, 2015.

TORRES, D.F et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da mamilite herpética em bovinos do Rioga Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1901-1904, set, 2009.

UFSM. **Histórico**, 2016. Disponível em: <
http://www.santamaria.rs.gov.br/images/campanhas/152anos/ufsm_historico.pdf >. Acesso em: 29 mar. 2016.

ANEXOS

ANEXO A- Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado na Embrapa Suínos e Aves.

<h1>Certificado</h1>		
Certifico que <u>INGRYD MERCHIORATTO</u>		
participou do (a) <u>Estágio no Laboratório de</u>		
<u>Sanidade e Genética Animal</u>		
realizado (a) em <u>Concórdia/SC – CNPSA</u>		
no período de <u>18/01/2016</u> a <u>04/03/2016</u> ,		
com carga horária de <u>180</u> horas.		
Concórdia, SC <u>03</u> de <u>março</u> de <u>2016</u>		
 Janice Reis Ciacci Zanella Chefe Geral		
		
<h2>Registro</h2>		
Certificado nº <u>07 / 2015</u>	Livro <u>01</u>	Folha <u>35v</u>
<u>Concórdia</u> , <u>SC</u>	<u>03/03/16</u>	<u>Elaine - SGP</u> <small>assinatura</small>
PROGRAMA		
Atividades desenvolvidas no laboratório de virologia de suínos:		
<ul style="list-style-type: none"> - Colheita de secreção nasal de suínos com suspeita de infecção pelo vírus influenza A, - Processamento de amostras de tecidos de suínos para diagnóstico de Senecavírus A, - Isolamento viral em células de linhagem e em ovos embrionados de galinhas SPF, - Extração de ácidos nucleicos virais, - RT-PCR e PCR para diagnóstico de influenza A, Senecavirus A e PCV2, - Clonagem de DNA viral. 		
Atividades desenvolvidas na granja de suínos – Núcleo de Conservação Genética:		
<ul style="list-style-type: none"> - Acompanhamento de coleta de sangue e exame de tuberculose, - Acompanhamento de parto e manejo de leitões recém-nascidos, - Coleta de sêmen e inseminação artificial em suínos 		
Atividades desenvolvidas na granja de aves:		
<ul style="list-style-type: none"> - Monitoria de Salmonella pullorum em granja de aves. 		
Outras atividades realizadas:		
<ul style="list-style-type: none"> - Apresentação de seminário sobre o vírus influenza A em suínos. 		
ORIENTADORA:		
Rejane Schaefer Meū. vet., DSc Embrapa Suínos e Aves		

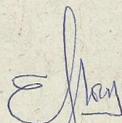
ANEXO B- Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no Setor de Virologia da UFSM.

SETOR DE VIROLOGIA
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que a acadêmica Ingrid Merchioratto realizou seu Estágio Prático Profissional do Curso de Medicina Veterinária da UNIPAMPA (matricula 112150085) no Setor de Virologia da UFSM sob supervisão do Prof. Eduardo Furtado Flores. O período de estágio transcorreu entre os dias 14 de março a 20 de maio de 2016, totalizando 368 horas. Neste período a acadêmica acompanhou e auxiliou na rotina de diagnóstico do SV/UFSM e teve a oportunidade de acompanhar e participar das aulas de Doenças Víricas da pós- graduação.

Santa Maria, 20 de maio de 2016



Eduardo F. Flores
Professor Titular
Setor de Virologia/UFSM
DMVP/CCR

Prédio 63A – Parque de Exposições
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria – RS, 97105-900 – Fone/Fax (55) 3220 8034, 8853, 8851 ou 8055