

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2003) 40:29-35
ISSN printed: 1413-9596
ISSN on-line: 1678-4456

Pesquisa de anticorpos contra o vírus da Estomatite Vesicular em bovinos de corte criados na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil em 2000

Vesicular Stomatitis: Serological Survey in beef cattle from region of Araçatuba, São Paulo State, Brazil in 2000

Eliana DE STEFANO¹;
Wanderley Pereira de ARAÚJO²;
Estevão de Camargo PASSOS³;
Edviges Maristela PITUCO¹

¹Instituto Biológico, São Paulo - SP

²Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP

³Instituto Pasteur, São Paulo - SP

Resumo

No ano de 2000 foram pesquisadas 1099 amostras de soro de bovinos de corte, adultos, pertencentes à seis rebanhos situados nos municípios de Auriflamma, Gastão Vidigal, Magda, Santo Antônio do Aracanguá, Sebastianópolis do Sul e Turiúba, região de Araçatuba. A técnica empregada para a dosagem de anticorpos para o vírus da Estomatite Vesicular foi a soroneutralização em microplacas, utilizando a cepa Indiana 1 Costa Rica/72 com título de $10^{6,0}$ DICT₅₀/50mL. As células utilizadas foram as da linhagem de Rim de Macaco Verde Africano (VERO-CCL 81), provenientes do American Type Cell Collection (ATCC). O título de anticorpos de cada amostra de soro, foi calculado como a recíproca da maior diluição do soro expresso em \log_{10} , que protegeu 100,00% da monocamada celular. Foram consideradas positivas as amostras com título superior a $1,6 \log_{10}$ (1/40). Das 1099 amostras de soro analisadas, 28 (2,50%) foram positivas ao vírus da Estomatite Vesicular tipo Indiana 1, com títulos de anticorpos variando de 1,9 à 2,8. Com exceção do rebanho situado no município de Turiúba, nos outros cinco foram encontrados animais reagentes ao vírus. Esta avaliação mostrou que houve circulação do vírus da Estomatite Vesicular nestes rebanhos provocando resposta humoral. Sendo assim é necessário a realização de estudos para se determinar o sítio de permanência do vírus.

Palavras-chave

Estomatite vesicular animal.
Anticorpos.
Bovinos de corte.

Correspondência para:

ELIANA DE STEFANO
Instituto Biológico
Laboratório de Vírus de Bovídeos
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252
04014-002 - São Paulo - SP
e-mail: stefano@biologico.br

Recebido para publicação: 05/04/2002
Aprovado para publicação: 06/05/2003

Introdução

A Estomatite Vesicular (EV) está incluída entre as enfermidades vesiculares dos bovinos e suínos, assim, ela assume papel importante para os

programas de saúde animal, principalmente por ser clinicamente semelhante à Febre Aftosa^{1,2}, sendo classificada na lista "A" na Oficina Internacional de Epizootias³. Isto significa que a EV é uma enfermidade

transmissível com um potencial de se difundir rapidamente, de graves conseqüências sócio-econômicas e de saúde pública e de grande importância para o comércio internacional de animais e seus derivados como sêmen e embriões^{4,5}.

O agente causal da EV pertence à Família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus* com dois tipos imunologicamente distintos classificados como New Jersey (NJ) e Indiana (Ind)⁶. Além de afetar eqüinos, bovinos e suínos, acomete mamíferos silvestres e também o homem^{7,8}. Ocorre de forma endêmica nas Américas sendo restrita ao hemisfério ocidental^{9,10}.

O modo pelo qual o vírus da EV é mantido na natureza durante os surtos endêmicos e epidêmicos e a forma de transmissão, não estão totalmente esclarecidos^{4,11}. Os surtos iniciam repentinamente durante o verão e aparecem simultaneamente em várias localidades de uma área restrita¹², e como o vírus foi isolado de mosquitos do gênero *Phlebotomus* e *Aedes*^{13,14}, estes fatos sugerem que poderia haver um ciclo do vírus entre animais silvestres e artrópodes.

Inquéritos sorológicos tem demonstrado a presença de anticorpos contra o vírus da EV em animais domésticos^{15,16,17,18,19} e em animais silvestres, como cervos, porco selvagem, morcegos, certos roedores, porco-espinho e várias espécies de primatas não-humanos^{20,21,22}.

No Brasil, Pustiglione Netto, Pinto e Suga²³ revelaram a presença de altos títulos de anticorpos após o surto da enfermidade em eqüinos ocorrido no município de Rancharia, SP, em abril de 1966. Kotait²⁴ na região do Vale do Paraíba, realizou um estudo epizootiológico da EV pesquisando anticorpos contra o vírus em amostras de soro de 2.181 bovinos e 482 eqüinos, pela técnica de imunodifusão em gel de ágar, e encontrou 21 (4,36%) eqüinos e

36 (1,64%) bovinos com sorologia positiva. Allende e Germano²⁵ analisaram 305 amostras de soro de bovinos, eqüinos e suínos, de áreas endêmicas no Brasil, com atividade do vírus Indiana 3 e encontraram 300/305 (98,40%) animais positivos para o vírus da EV Indiana 3 pela técnica de soroneutralização. Em 1998, em um foco de EV ocorrido no município de Bela Vista, Santa Catarina, Lopes et al.²⁶ não detectaram anticorpos específicos contra o vírus nas amostras de soro dos animais acometidos, fato explicado pelos autores devido à baixa imunogenicidade e/ou fugacidade da resposta humoral. Com relação ao tipo NJ, não há relatos de sua ocorrência no Brasil.

Em virtude da EV ser clinicamente confundível com a Febre Aftosa, que está em fase de erradicação em alguns Estados brasileiros, e também devido ao comércio internacional de animais e de seus produtos e subprodutos, é imprescindível que se realize o diagnóstico diferencial com a Febre Aftosa, uma vez que apenas a avaliação clínica não é suficiente para confirmação do agente etiológico.

Por ser a região de Araçatuba a segunda mais importante em bovinocultura de corte do Estado de São Paulo, representando 16,20% do plantel Estadual, de acordo com o projeto LUPA²⁷ de 1997, foram selecionados alguns municípios daquela região, para a realização do presente trabalho que teve como objetivo verificar a presença de anticorpos contra o vírus da EV em rebanhos bovinos de corte criados em regime extensivo.

Material e Método

Foram coletadas 1099 amostras de sangue de bovinos adultos, por meio de punção da veia jugular, pertencentes à seis propriedades, sendo 290 soros do município de Auriflama, 120 soros de Gastão Vidigal, 176 soros de Magda,

167 soros de Santo Antônio do Aracanguá, 168 soros de Sebastianópolis do Sul e 178 soros de Turiúba. Os soros obtidos foram transferidos para tubos plásticos tipo KMA, estéreis, inativados em banho-maria, à temperatura de 56°C durante 30 minutos e armazenados em freezer à temperatura de -20°C até o processamento.

A técnica utilizada para a dosagem de anticorpos contra o vírus da EV foi a soroneutralização, segundo a Oficce International des Epizooties³.

As células utilizadas tanto para a produção do estoque viral como para a reação de soroneutralização, foram as da linhagem de Rim de Macaco Verde Africano (VERO-CCL 81) provenientes do American Type Cell Collection (ATCC) na passagem 120. Sua manutenção foi realizada em garrafas plásticas, marca Costar, de 175 cm² de área, utilizando-se o Meio Essencial Mínimo de Eagle (Eagle-MEM) com sais de Earle e L-glutamina, acrescido de 5.00% de soro fetal bovino e sem

adição de antibióticos.

A cepa do vírus da EV utilizada foi Indiana 1 Costa Rica/72, com título de 10^{6,0} DICT₅₀/50mL, calculado pelo método de Reed e Muench²⁸.

Foram consideradas positivas as amostras de soro com títulos superiores a 1,6 (1/40), segundo a Oficce International des Epizooties³.

Resultados

Verificou-se que das 1099 amostras de soro analisadas, 28 (2,50%) foram positivas frente ao vírus da EV tipo Indiana 1, com títulos de anticorpos variando de 1,9 à 2,8. Foi observado ainda que 78,60% (22/28) dos animais sororeagentes apresentaram título de 1,9 (Tabelas 1, 2).

A propriedade situada no município de Auriflama teve uma frequência de positividade de 32,10% (9/28), que foi a maior observada em todas as propriedades estudadas.

Em relação à propriedade situada no município de Turiúba,

Tabela 1

Número e porcentagem de bovinos com anticorpos contra o vírus da Estomatite Vesicular tipo Indiana 1, segundo os municípios da região de Araçatuba. São Paulo, 2001

MUNICÍPIOS	Nº de Amostras	Reagentes/Propriedade (N %)		Reagentes Total (%)
Auriflama	290	9	3,1	0,819
Gastão Vidigal	120	4	3,3	0,364
Magda	176	4	2,3	0,364
Sebastianópolis do Sul	168	4	2,4	0,364
Santo Antônio do Aracanguá	167	7	4,2	0,637
Turiúba	178	-	-	0
TOTAL	1099	28	2,5	2,548

Tabela 2

Distribuição dos animais sororeagentes ao vírus da Estomatite Vesicular Indiana 1, segundo os títulos (log10) e os municípios. São Paulo, 2001

MUNICÍPIOS	1,9		2,2		2,5		2,8		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Auriflama	6	27,3	1	25,0	1	100,0	1	100,0	9	32,1
Gastão Vidigal	4	8,2	-	-	-	-	-	-	4	14,3
Magda	4	18,2	-	-	-	-	-	-	4	14,3
Sebastianópolis do Sul	3	13,6	1	25,0	-	-	-	-	4	14,3
Sto. Ant. do Aracanguá	5	2,3	2	50,0	-	-	-	-	7	25,0
Turiúba	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	22		4		1		1		28	

considerando-se que o valor adotado como ponto de corte foi de 1,6, verificou-se que todos os 178 animais examinados foram soronegativos ao vírus da EV tipo Indiana 1.

Discussão e Conclusões

A pouca literatura brasileira disponível sobre EV dificulta a análise dos resultados obtidos. Embora não tenham sido encontrados casos clínicos da doença, verificou-se, nas cinco propriedades situadas na região de Araçatuba, que abrangeu os municípios de Auriflama, Gastão Vidigal, Magda, Santo Antônio do Aracanguá e Sebastianópolis do Sul, a presença de animais sororeagentes ao vírus da EV tipo Indiana 1. A detecção de anticorpos mesmo sem ocorrência de casos clínicos da enfermidade, sugerem uma exposição prévia dos animais ao vírus. Tal fato vem ao encontro dos achados no México por De Anda et al.¹⁷ que verificaram a presença de anticorpos em bovinos, com uma porcentagem de positividade de 13% e 36%, respectivamente, para os vírus da EV tipos Indiana e New Jersey, mesmo sem a ocorrência de casos clínicos da doença.

Segundo Sorenson et al.²⁹, a presença de anticorpos com pequena queda após quatro anos e em algumas vezes após oito anos, sugere que o vírus persiste no animal em uma forma capaz de estimular a produção contínua de anticorpos. Verificaram ainda que flutuações no título de anticorpos poderia indicar “escapes periódicos” do vírus e subsequente retorno ao foco crônico.

Alguns fatores poderiam explicar esta soropositividade como a presença do vírus nos tecidos, demonstrado experimentalmente por Letchworth et al.³⁰ para o vírus da EV tipo New Jersey, detectado pela reação

em cadeia da polimerase (PCR); a presença de artrópodes e de animais silvestres livres nas propriedades, uma vez que o vírus já foi isolado de mosquitos do gênero *Phlebotomus* e *Aedes*^{13,14} e também foram detectados anticorpos em mamíferos selvagens^{20,21,31}.

A frequência baixa de casos positivos (2,50%) vem ao encontro dos dados obtidos por Kotait²⁴, que observou após um surto ocorrido em 1986 na região do Vale do Paraíba, São Paulo, em bovinos e eqüinos com sinais clínicos da doença, a presença de anticorpos contra o vírus da EV Indiana 3 em 1,64% (36/2.181) bovinos e 4,36% (21/482) eqüinos pela técnica de imunodifusão em gel de ágar.

Nas áreas endêmicas onde o vírus circula nas populações, é comum o encontro de animais reagentes aos testes sorológicos contra os tipos Indiana e New Jersey. Os estudos realizados na Costa Rica por Rodrigues et al.¹⁹ e Atwill et al.¹⁶ e nos Estados Unidos por Mumford et al.¹⁸ confirmaram essas afirmações. Esses pesquisadores observaram nos bovinos prevalência para o tipo New Jersey de 94,20%¹⁹, 46%¹⁶ e 15.^{00%18} e para os eqüinos de 37%¹⁸ e, para os bovinos o tipo Indiana 15,20%¹⁹ e 21%¹⁶. Por outro lado, em 1998, Lopes et al.²⁶ em um foco de EV ocorrido no município de Bela Vista, Santa Catarina, confirmado por detecção do vírus em ELISA de captura, não detectaram anticorpos específicos contra o vírus nas amostras de soro dos animais acometidos dos quais o vírus foi isolado, fato explicado pelos autores como a baixa imunogenicidade e/ou fugacidade da resposta humoral.

Os resultados desta pesquisa foram discordantes aos obtidos por Allende e Germano²⁵ que observaram 98% (300/305) de animais reagentes pela

técnica de soroneutralização, ressaltando-se que neste caso, o ponto de corte adotado foi igual ou maior 1,3 (1/20).

Como é uma enfermidade de grande impacto econômico, por sua semelhança com a Febre Aftosa e devido a escassez de dados na literatura nacional, é necessário que se realizem novos estudos sobre a etiopatogenia desta enfermidade em bovinos, para determinar quais os prováveis sítios de alojamento do vírus que induzem a manutenção de uma resposta imune

humoral, sem sinais clínicos. Além desses aspectos, é fundamental, também, pesquisar qual o papel dos artrópodes e espécies silvestres na manutenção do vírus na natureza.

Desta forma verificou-se a presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus da Estomatite Vesicular em bovinos de corte, criados nos municípios de Aurifloma, Gastão Vidigal, Magda, Santo Antônio do Aracanguá e Sebastianópolis do Sul, região de Araçatuba-SP.

Summary

In 2000 a total of 1099 serum samples were obtained of adult beef cattle, from 6 herds located at Aurifloma, Gastão Vidigal, Magda, Santo Antônio do Aracanguá, Sebastianópolis do Sul e Turiúba, counties from the region of Araçatuba. Sera were tested for neutralizing antibodies to vesicular stomatitis virus by microtiter neutralization assay, using the virus strain Indiana 1 Costa Rica/72 with $10^{6.0}$ DICT₅₀/50mL. The indicator cells were African green monkey kidney (VERO-CCL 81), purchased from American Type Cell Collection (ATCC). The neutralization titers of each serum were the reciprocal of the highest dilution expressed at \log_{10} that protected 100.00% of the cell monolayer. Sera with values above 1,6 \log_{10} (1/40) were considered positive for Vesicular Stomatitis virus. Twenty-eight (2.50%) out of 1.099 samples were positive for Vesicular Stomatitis virus Indiana 1, with antibodies titers ranging from 1.9 to 2.8. Except in Turiuba, in the others 5 herds there were positive animals. The presente survey showed the presence the Vesicular Stomatitis virus in the herds stimulating the humoral response. More studies are necessary to verify the site of persistence of the virus.

Key-words:

Vesicular Stomatitis.
Antibodies.
Beef cattle.

Referências

1. MASON, J. La Epidemiologia de la Estomatitis Vesicular. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v. 29-30, p. 13-33, 1978.
2. PEREZ, E.; CORNELISSEN, B. Retrospective study of the temporal distribution of vesicular stomatitis in cattle in Costa Rica, 1972-1986. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 6, p. 1-8, 1988.
3. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Vesicular Stomatitis. In: **Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines**. 3rd ed. Paris: OIE, 1996. p. 57-63.
4. BRIDGES, V.E.; MCCLUSKEY, B.J.; SALMAN, M.D.; SCOTT HURD, H.; DICK, J. Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 5, p. 556-560, 1997.
5. HAYEK, A. M.; MCCLUSKEY, B. J.; CHAVEZ, G. T.; SALMAN, M. D. Financial Impact of the 1995 outbreak of vesicular stomatitis on 16 beef ranches in Colorado. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 6, p. 820-823, 1998.v
6. ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M. S. Caracterizacion antigenica e inmunogenica de varias cepas del sorotipo Indiana de

- estomatitis vesicular aisladas en Brasil. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v. 51, n. , p. 23-26, 1985.
7. CHAVERRI, E. P. La Estomatite Vesicular como zoonosis. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 68, n. 3, p. 223-229, 1970.
 8. QUIROZ, E.; MORENO, N.; PERALTA, P. H.; TESH, R. B. A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, n. 3, p. 312-314, 1988.
 9. LETCHWORTH, G. J.; RODRIGUEZ, L. L.; BARRERA, J. D. C. Vesicular Stomatitis. **Veterinary Journal**, v. 157, p. 239-260, 1999.
 10. WILKS, C. R. Vesicular stomatitis and other vesiculovirus infections. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C., (Ed.). **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford: University Press, 1994. v. 1, p. 563-566.
 11. VANLEEUEWEN, J. A.; RODRIGUEZ, L. L.; WALTNER-TOEWS, D. Cow, farm and ecologic risk factors of clinical vesicular stomatitis on Costa Rican dairy farms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 4, p. 342-350, 1995.
 12. JONKERS, A. H. The epizootiology of the vesicular stomatitis viruses: a reappraisal. **American Journal of Epidemiology**, v. 86, n. 2, p. 286-291, 1967.
 13. SHELOKOV, A. L.; PERALTA, P.H. Vesicular Stomatitis Virus, Indiana Type: an arbovirus infection of tropical sandflies and humans. **American Journal of Epidemiology**, v. 86, n. 1, p. 149-157, 1967.
 14. TESH, R. B.; BOSHELL, J.; MODI, G. B.; MORALES, A. A.; YOUNG, D. G.; CORREDOR, A. A.; CARRASQUILLA, C. F.; RODRIGUEZ, C.; WALTERS, L. L.; GAITAN, M. O. Natural infection of humans, animals, and phlebotomine sand flies with the Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 3, p. 653-661, 1987.
 15. ALONSO FERNANDEZ, A.; MARTINS, M.; GOMES, M.P.D.; ALLENDE, R.; SÖNDAHL, M.S. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection, typing and subtyping of vesicular stomatitis virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 287-292, 1991.
 16. ATWILL, E. R.; RODRIGUES, L. L.; HIRD, D. W.; ROJAS, O. Environmental and host factors associated with seropositivity to New Jersey and Indiana vesicular stomatitis viruses in Costa Rica cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, p. 303-314, 1993.
 17. DE ANDA, J. H.; SALMAN, M. D.; MASON, J.; KEEFE, T. J.; WEBB, P. A.; REIF, J. S.; AKKINA, R. A prospective study of vesicular stomatitis in cattle in an enzootic region of Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, p. 209-215, 1992.
 18. MUMFORD, E. L.; MCCLUSKEY, B. J.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; SCHMITT, B. J.; SALMAN, M. D. Public veterinary medicine: public health. Serologic evaluation of vesicular stomatitis virus exposure in horses and cattle in 1996. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 9, p. 1265-1269, 1998.
 19. RODRIGUEZ, L. L.; VERNON, S.; MORALES, A. I.; LETCHWORTH, G. J. Serological monitoring of vesicular stomatitis New Jersey virus in enzootic regions of Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 272-281, 1990.
 20. STALLKNECHT, D. E.; NETTLES, V. F.; FLETCHER, W. O.; ERICSON, G. A. Enzootic vesicular stomatitis New Jersey type in an insular wild swine population. **American Journal of Epidemiology**, v. 125, n. , p. 1058-1065, 1985.
 21. STALLKNECHT, D. E.; ERICKSON, G. A. Antibodies to vesicular stomatitis New Jersey type virus in a population of white-tailed deer. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 250-254, 1986.
 22. YUILL, T. M. Vesicular Stomatitis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H., (Ed.). **CRC handbook series in zoonoses**. Florida: Boca Raton, 1981. v. 1B, p. 125-142.
 23. PUSTIGLIONE NETTO, L.; PINTO, A. A.; SUGA, O. Isolamento do vírus, identificação sorológica e levantamento epizootiológico de um surto de Estomatite Vesicular no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 34, n. 2, p. 69-72, 1967.
 24. KOTAIT, I. **Estudo epidemiológico da estomatite vesicular no Vale do Paraíba, São Paulo**. 1990. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.
 25. ALLENDE, R.; GERMANO, P. M. L. Comparison of virus neutralisation and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 12, n. 3, p. 849-855, 1993.
 26. LOPES, S. S.; MARQUES, J. L. L.; VIDAL, C. E. S.; SILVA, R. A. M. S. Caso de estomatite vesicular em bovinos na área livre de febre aftosa com vacinação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p. 126, 1999. Suplemento. Resumo apresentado no Congresso Brasileiro de Buiatria, em São Paulo em 1999.
 27. SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Instituto de Economia Agrícola. **Projeto Lupa: levantamento censitário de unidades de**

- produção agrícola do Estado de São Paulo. São Paulo: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1997.
28. REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
 29. SORENSON, D. K.; CHOW, T. L.; KOWALCZYK, T.; HANSON, R. P.; BRANDLY, C. A. Persistence in cattle of serum-neutralizing antibodies of vesicular stomatitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. , p. 74-77, 1958.
 30. LETCHWORTH, G. J.; BARRERA, J. D. C.; FISHEL, J. R.; RODRIGUEZ, L. L. Vesicular Stomatitis New Jersey Virus RNA Persistis in Cattle Following Convalescence. **Virology**, v. 219, n. 2, p. 480-484, 1996.
 31. JIMÉNEZ, A. E.; JIMÉNEZ, C.; CASTRO, L.; RODRIGUEZ, L. Serological survey of small mammals in a vesicular stomatitis virus enzootic area. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. , p. 247-249, 1996.