

DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS NA REGIÃO DE ARAÇATUBA, SÃO PAULO, BRASIL

ADRIANA HELLMEISTER DE CAMPOS NOGUEIRA,¹ EDVIGES MARISTELA PITUCO,¹ ELIANA DE STEFANO,¹
VERA CLÁUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI² E TEREZA CRISTINA CARDOSO³

1. Pesquisadora científica, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal, Laboratório de Vírus de Bovídeos, São Paulo, SP. – E-mail: adrianogueira@biologico.sp.gov.br

2. Pesquisadora científica, APTA, Pólo Extremo Oeste, Araçatuba

3. Professora adjunta do Departamento de Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Laboratório de Virologia, Araçatuba.

RESUMO

A língua azul é uma doença viral, cujo agente etiológico pertence à família Reoviridae, gênero Orbivirus, transmitida por um vetor (artrópode) hematófago, do gênero Culicoides. Os animais acometidos são ruminantes domésticos e selvagens, porém os pequenos ruminantes são os mais afetados. O estudo teve como objetivo detectar a presença de anticorpos para língua azul em ovinos da região de Araçatuba, por possuir um rebanho expressivo e condições climáticas favoráveis à multiplicação de insetos. Foram analisadas 1.002 amostras de soros ovinos, provenientes de

31 cabanhas, pelas provas de imunodifusão dupla em gel de ágar (AGID) e ELISA (*Enzyme Linked immunosorbent Assay*) de competição da fase sólida (ELISA CFS), provenientes do Centro Panamericano de Febre Aftosa. Desses soros, 651 (65%) foram reagentes ao vírus da língua azul, pela técnica de AGID, e 742 (74,1%) ao teste de ELISA-CFS. Esses resultados sugerem que o vírus da língua azul encontra-se disseminado nessas regiões, ocasionando infecções inaparentes.

PALAVRAS-CHAVES: AGID, ELISA, inquérito soropidemiológico, vírus da língua azul.

ABSTRACT

DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST THE BLUETONGUE VIRUS IN SHEEP IN THE REGION OF ARAÇATUBA, SÃO PAULO, BRAZIL

Bluetongue (BT) is an infectious, insect-born viral disease of ruminants. The causative agent of BT is bluetongue virus (BTV) that belongs to the family *Reoviridae* genus *Orbivirus*. Insect vectors in the genus *Culicoides* transmit this virus. BT affects domestic and wild ruminants, however small ruminants are considered the most affected specie. The aim of the study was to detect antibodies against BTV in commercial sheep farms, of the Northeastern region of Sao Paulo State, Brazil. A total of 1002 sera samples collected

from adult sheep (above 1 year-old), comprising a total of 31 farms, were screened for the presence of BTV antibodies, by agar gel immunodiffusion test (AGID) and ELISA-CFS (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – competitive solid phase), both produced by Pan American Center of FMDV. From a total of 1002 samples, 651 (65%) were positive by AGID and 742 (74.1%), were positive by ELISA-CFS. These results suggest that the BTV is widespread among farms, probably causing subclinical infections.

KEY WORDS: AGID, bluetongue virus, ELISA-CFS, seroepidemiological survey.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de viroses é comum nos rebanhos ovinos e, em determinadas circunstâncias, são inevitáveis os prejuízos advindos pela introdução e disseminação dessas doenças no rebanho (PINHEIRO et al., 2003).

Nesse contexto, a natureza de uma doença, especialmente sua epidemiologia e o potencial de disseminação desta sobre populações animais, é fator relevante e preocupação dos veterinários devido à morbidade, mortalidade e seu caráter endêmico (GARNER & LACK, 1995).

A língua azul (BT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2008), e, como consequência, há restrições à movimentação internacional dos animais e seus produtos. Essa enfermidade, reconhecida pela primeira vez na África do Sul no final do século XVIII, descrita em detalhe por HUTCHEN em 1902, foi denominada “epizootia catarral das ovelhas”. Em 1902, ainda sem conhecer a etiologia, foi proposto o nome de língua azul (RONDEROS et al., 2003), em virtude da inflamação observada na língua e na mucosa oral, que apresenta uma coloração roxo-escura ou azulada. Em 1906, demonstrou-se que a doença era causada por vírus, injetando-se sangue filtrado de ovelhas doentes em animais susceptíveis, reproduzindo, assim, a doença clínica (THEILER, 1906).

Segundo relatam CUNHA et al. (1987, 1988), a BT surgiu no Brasil em decorrência da importação de animais de raças leiteiras infectados. Primeiramente foi relatada por SILVA (1978), que descreveu anticorpos contra o vírus da língua azul (VLA) em ovinos e bovinos no Estado de São Paulo.

Ruminantes são susceptíveis ao vírus causador da BT e em geral a infecção ocorre de forma não aparente, com exceção dos ovinos, que manifestam sinais evidentes, com diminuição na produção e mortalidade elevada (LOBATO, 1999). Segundo ERASMUS (1975), os sinais observados com mais frequência são edema facial, erosão e ulceração do trato gastrointestinal, coronite com consequente claudicação e febre alta, confundindo com outras enfermidades, como a febre aftosa.

O BTV é o protótipo do gênero Orbivirus, da família Reoviridae, os quais são arbovírus, transmitidos por artrópodes (FENNER et al., 1992), que se infectam ao ingerirem sangue de vertebrados no período de viremia, com replicação viral nos tecidos dos artrópodes, que os transmitem através da picada (JUBB et al., 1993).

São conhecidos 24 sorotipos (FENNER et al., 1993), transmitidos principalmente por um inseto do gênero Culicoides (RONDEROS et al., 2003) denominado “mosquito-pólvora”, mas também foi isolado de moscas de ovinos (*Melophagus ovinus*) e piolhos de bovinos (*Haematopinus eurysternus*) (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1975). O BTV depende dos mosquitos vetores para se manter na natureza, sendo as condições de temperatura e umidade, na grande parte do país, fatores que favorecem a multiplicação e manutenção dos insetos, caracterizando a endemia. As mudanças climáticas em regiões limítrofes de endemias, movimentações de animais, mudanças nas características da estação chuvosa e, principalmente, movimento dos ventos podem trazer os vetores de regiões distantes para áreas livres da doença (LOBATO, 1999).

A transmissão venérea por meio de sêmen contaminado e transmissão congênita do BTV podem ocorrer em ruminantes (MICHELSEN, 1990; FENNER et al., 1993), mas o risco é bem menor quando comparado à importação de animais vivos, pois o vírus só é eliminado no sêmen temporariamente, durante o período de viremia (ROBERTS et al., 1993), sendo a sua presença provavelmente associada com traços de sangue infectado com o vírus, proveniente do trato genital.

Com o objetivo de verificar a presença de anticorpos para essa enfermidade nos municípios pertencentes à Região Administrativa (RA) de Araçatuba, foram realizados testes sorológicos visando à detecção de anticorpos, mediante a utilização dos testes de AGID e ELISA – CFS. A escolha da região ocorreu em virtude da crescente expansão da criação de ovinos e das condições climáticas favoráveis à multiplicação e disseminação dos mosquitos *Culicoides*. NOGUEIRA & JUNIOR (2005) demonstram que o plantel de ovinos do Estado de São Paulo está concentrado

nos Escritórios de Desenvolvimento Regionais (EDRs) de Marília, Araçatuba, São José do Rio Preto, Botucatu e Andradina, sendo que Araçatuba detém o segundo maior rebanho desse Estado (IBGE, 2008). O conhecimento da situação da infecção contribuirá para a implementação de medidas sanitárias adequadas à região.

MATERIAL E MÉTODOS

Região de estudo e amostragem

A região escolhida foi Araçatuba, incluindo a área urbana e rural, com 470km², localização de latitude 21°11' 50" e longitude 50°25' 52". O clima é semiárido, com chuvas localizadas no verão e um inverno extremamente seco e umidade relativa do ar de 37%, calculada neste último ano. O número de animais em manejo de criação comercial no Brasil é de aproximadamente 16.019.170 animais cadastrados, sendo que 664.422 estão localizados na região Sudeste (IBGE, 2008). Este número representa aproximadamente 4% do rebanho nacional, sendo a região mais produtora o município de São José do Rio Preto, representando 20%, e em segundo lugar a cidade de Araçatuba e região, com 12%.

As amostras foram colhidas ao longo do ano de 2006, de ovinos adultos, em fase reprodutiva (acima de doze meses e com pelo menos uma parição, ou em caso de machos sexualmente maduros) e sem sintomas característicos da doença, de ambos os sexos, cadastrados no Núcleo de Produtores de Ovinos da Região de Araçatuba, distribuídas nos municípios da RA de Araçatuba.

O número mínimo de amostras de soro a serem testadas foi calculado mediante a fórmula estatística $n = z^2 \cdot P \cdot Q / \varepsilon^2$ ($n = 784$), segundo a prevalência de 50%, nível de confiança de 95% e precisão relativa de 7%. Entretanto, neste estudo utilizaram-se 1.002 amostras, o que diminuiu a margem de erro para 3%, oferecendo resultados mais fidedignos da situação da língua azul na região.

A amostragem nas propriedades foi realizada levando-se em conta o número total de reprodutores, coletando-se 20% desse total.

Obtenção das amostras

As colheitas de sangue foram realizadas após assepsia local, por punção da veia jugular, com tubos de ensaio a vácuo sem anticoagulante. Manteve-se o sangue obtido em repouso à temperatura ambiente até a completa retração do coágulo para a separação da fração sérica. Para melhor separação do soro, foi realizada a centrifugação (900xg, cinco minutos), sendo transferido para tubos de 1,5 mL, devidamente identificados e armazenados a -20°C até a realização dos testes.

Detecção de anticorpos para o vírus da língua azul (BTV)

As amostras foram submetidas aos testes de imunodifusão dupla em gel de ágar (AGID) e ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) competitivo em fase sólida (ELISA-CFS), fornecidos pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, realizados segundo protocolo do fabricante. Realizaram-se os ensaios no Laboratório de Vírus dos Bovídeos do Instituto Biológico, SP. Todos os procedimentos adotados seguiram as recomendações da OIE.

Análise estatística

A associação entre a presença de anticorpos e o sexo foi determinada utilizando-se o teste do qui-quadrado. Consideraram-se valores de $P < 0,05$ significativos.

RESULTADOS

Os resultados revelaram que 74,1% (742/1002) dos animais testados possuem anticorpos para o BTV pelo ELISA CFS, e 65% (651/1002) apresentaram reatividade positiva para os *Orbivirus* pela técnica de AGID.

Em todas as 31 cabanhas encontraram-se ovinos soropositivos, indicando que o agente está amplamente disseminado nessa região.

Uma das explicações para o elevado número de animais soropositivos pode estar no clima da região, com temperaturas entre 13 e 35°C, favorá-

veis à multiplicação dos Culicoides, que requerem calor e umidade, para se reproduzirem, bem como clima úmido quente e calmo, para se alimentarem. Essa condição favorável na região estudada ocorre na maior parte do ano e, sendo assim, o clima representa o principal fator de risco (WARD & THURMOND, 1995). Outro fator de risco é a presença de grande quantidade de bovinos nessa região, tendo em vista que a longa viremia nesses

animais atua como reservatório, a partir do qual os vetores podem se infectar e transmitir o vírus a outros ruminantes como os ovinos (GORCHS & LAGER, 2001). A viremia em bovinos pode chegar a setenta dias e em ovinos varia de 14 a 28 dias (FENNER et al., 1993).

Em relação ao sexo dos animais, não houve diferença estatística, conforme demonstra a Tabela 1.

TABELA 1. Distribuição da positividade em relação ao sexo dos animais e às técnicas empregadas

Variável	Categoria	AGID						p *
		Positivo		Negativo		Total		
		N	%	N	%	N	%	
Sexo	Fêmea	576	64,5	317	35,5	893	100	0,3737
	Macho	75	68,8	34	31,2	109	100	
	Total	651	65,0	351	35,0	1.002		
Variável	Categoria	ELISA						p *
		Positivo		Negativo		Total		
		N	%	N	%	N	%	
Sexo	Fêmea	663	74,2	230	25,8	893	100	0,6911
	Macho	79	72,5	30	27,5	109	100	
	Total	742	74,1	260	25,9	1.002		

p * = Teste de qui quadrado / p < 0,05 significativo; N = número

Poucos estudos em ovinos estão disponíveis no Brasil. Até o momento, não havia relatos da ocorrência de soropositividade para a BT em ovinos na região estudada.

Utilizando a AGID, CUNHA et al. (1988) examinaram 66 soros de ovinos provenientes de onze municípios do Estado do Rio de Janeiro, obtendo 24,24% (16/66) de positividade. COSTA et al. (2006), nas mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul, em ovinos, registraram a prevalência de 0,16% para BT (2/1331).

A alta frequência obtida nos estudos sorológicos, sem sinais clínicos característicos da doença no campo, indicam que o BT espalha-se pelos animais no país de forma silenciosa. Condições de temperatura e umidade na região estudada favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores, facilitando a endemidade da doença.

No Brasil, pouco se conhece sobre a doença e sorotipos presentes, o que impede a discussão sobre o uso de vacinas para o controle da doença e dificulta a implementação de medidas seguras para movimentação de animais. Até o momento, os sorotipos 4 e 12 foram isolados no Brasil (CLAVIJO et al., 2002).

Diante da possibilidade de disseminação do vírus para regiões de clima temperado (mudanças climáticas), bem como da introdução de novos sorotipos em regiões onde a doença é endêmica e, conseqüentemente, do maior rigor na movimentação de animais, é válido incentivar pesquisas científicas direcionadas para o território brasileiro.

Assim, para controlar a doença e mitigar o risco da introdução de novos sorotipos em áreas específicas, é essencial que se conheça a situação da doença no País. Esse conhecimento possibili-

tará fazer vigilância e evitar consequências socioeconômicas. Novos estudos podem ser realizados mediante os dados aqui relatados.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio na forma de auxílio à pesquisa (Processo 2006/54397-5).

REFERÊNCIAS

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SI, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J. W. Isolation of bluetongue vírus serotype 12 from na outbreak of the disease in South América. **Veterinary Record**, v. 7, p. 301-302, 2002.

COSTA, J. R. R.; LOBATO, Z. I. P.; HERRMENN, G. P.; LEITE, R. C.; HADDAD, J. P. A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 273-275, 2006.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; PASSOS, W. S. Anticorpos para o vírus da língua azul em soros de bovinos do Estado de São Paulo e Região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 6, p. 121-124, 1987.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A. C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**, v. 3, supl. 2, p. 53-56, 1988.

ERASMUS, B. J. Bluetongue in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal** v. 51, p. 165, 1975.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Reoviridae in veterinary virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 537-552.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. Virologia veterinária. In: _____. **Reoviridae**. Espanha: Acribia, 1992. cap. 32, p. 601-618.

GARNER, M. G.; LACK, M. B. Modelling the potential impact of exotic diseases on regional Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, n. 3, p. 81-87, 1995.

GORCHS, C. & LAGER, I. Actualización sobre el agente y la enfermedad. **Revista Argentina Microbiologia**, v. 33, p. 122-132, 2001.

HOURRIGAN, J. L.; KLINGSPORN, A. L. The epizootiology of bluetongue: the situation in the United States of America. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 203-208, 1975.

HUTCHEN, D. Malarial catarral fever of sheep. **Veterinary Record**, v. 14, p. 629, 1902.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=21&i=P>>. Acesso em: 2 abr. 2008.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, p. 173-175.

LOBATO, Z. I. P. Língua azul: a doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 4, p. 515-523, 1999.

MICHELSEN, P. G. Língua azul. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1990. v. 1, p. 728-731.

NOGUEIRA, E. A.; JUNIOR, S. N. Ovinos e caprinos avançam em São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.1.9. Bluetongue virus. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00032.htm>. Acesso em: 24 jan. 2008.

PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. **Viroses dos pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. p. 13-17.

ROBERTS, D. H.; LUCAS, M. H.; BELL, R. A. Animal and animal product importation and assessment of risk from bluetongue and other ruminant orbiviruses. **British Veterinary Journal**, v. 149, p. 87-99, 1993.

RONDEROS, M. M.; SPINELLI, G. R.; LAGER, I.; DIAZ, F. La importância sanitária de los jejenos del género *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) em la Argentina. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 601-612, 2003 .

SILVA, F. J. F. **Estudos de ocorrência da língua azul em São Paulo**: Comissão de Estudos do Ministério da Agricultura, fev. 1978. Portaria Ministerial n.150 (relatório).

THEILER, A. Bluetongue in sheep. **Directory of Agriculture Annual Report for 1904-1905**, p. 101-12L, 1906.

viruses in Queensland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 24, p. 129-136, 1995.

WARD, M. P.; THURMOND, M. C. Climatic factors associated with risks of seroconversion of cattle to bluetongue

Protocolado em: 19 abr. 2008. Aceito em: 24 mar. 2009.