

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na
região Sudeste do Brasil**

**Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na
região Sudeste do Brasil**

Leandro Lima Rossignolo Venditti

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico,
da Agência Paulista de Tecnologia dos
Agronegócios, para obtenção do título de
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal,
Segurança Alimentar e o Ambiente

Orientadora: Edviges Maristela Pituco

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca
Instituto Biológico
Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Venditti, Leandro Lima Rossignolo
Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil. / Leandro Lima Rossignolo Venditti. –São Paulo, 2009.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na produção animal.

Orientadora: Edviges Maristela Pituco

Versão do título para o inglês: Infection of bluetongue virus in sheep and cattle in southeastern Brazil.

1. BTV 2. Sangue 3. Sêmen 4. nested RT-PCR 5. IDGA 6. ELISA-CFS I.Pituco, Edviges Maristela II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título

IB/Bibl/2009/008



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Leandro Lima Rossignolo Venditti

Título: Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil

Orientadora: Edviges Maristela Pituco

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Profa. Dra.: **Edviges Maristela Pituco**

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. Dr.: **Leonardo Jose Richtzenhain**

Instituição: FMVZ/USP

Assinatura:

Profa. Dra.: **Alice Maria Melville Paiva Della Libera**

Instituição: FMVZ/USP

Essa Dissertação é dedicada a minha mãe Angela Maria e a meu pai Antonio Luiz, pelo incentivo, força, carinho e por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas. Amo vocês

Agradecimentos

A Deus pela minha vida.

À minha mãe, Angela Maria e a meu pai Antonio Luiz, pelo apoio, compreensão, confiança e amor.

A meu irmão, Marcelo Venditti, pela companhia e por fazer desse período mais alegre.

A vovó, Vânia e a vovô José Castilho Lima, pela torcida, força e carinho que mesmo de longe, foi valiosa.

A vovó Yolanda Venditti pela constante preocupação e carinho.

Ao vovô Antonio Venditti (*in memoriam*) pelo exemplo de vida.

A meu tio Cacá, pelo incentivo, preocupação e por estar sempre pronto a ajudar.

A toda minha família.

A Cybele, minha namorada, que sempre me apoiou e deu força, pelo carinho, compreensão, bons conselhos e paciência. Amo você

Aos amigos de longa data, Eduardo e Bruno.

A turma XIII do curso de Medicina Veterinária – Unesp Araçatuba.

A Pesquisadora Maristela Pituco, minha orientadora, pelo aprendizado, profissionalismo, incentivo e total colaboração.

A Pesquisadora Adriana Nogueira, pela ajuda nas colheitas das amostras e por sempre se mostrar prestativa.

A Nara Thiers, pela ajuda nas análises laboratoriais e constante disponibilidade.

Aos colegas de Pós-Graduação, especialmente a turma do mestrado, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Ao Instituto Biológico pela oportunidade da realização deste curso.

Ao Laboratório de Víroses de Bovídeos pela contribuição, e fornecimento de equipamento que permitiu a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Víroses de Bovídeos – Instituto Biológico (LVB): Eliana, Líria, Cláudia Pestana, Simone, César, Monik, Marília, Alisete, Tia Gel, Regina, Washington.

Aos proprietários das cabanhas de Araçatuba e Sorocaba que permitiram a colheita das amostras.

Ao professor Vitor Gonçalves pela ajuda com a estatística.

Aos professores dos cursos de Pós Graduação do Instituto Biológico, pela atenção e colaboração.

A FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

“De tudo, ficaram três coisas: A certeza de que estamos sempre começando... A certeza de que precisamos continuar... A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.... Portanto devemos: Fazer da interrupção, um caminho novo ... Da queda, um passo de dança... Do medo, uma escada... Do sonho, uma ponte... Da procura, um encontro...”

Fernando Sabino

Resumo

Avaliou-se a ocorrência da língua azul em ovinos do Estado de São Paulo e bovinos de Centrais de Inseminação da região Sudeste do Brasil, por meio de técnicas moleculares e sorológicas. Foram analisados 13 rebanhos ovinos, num total de 538 animais, com idade entre 37 meses, pertencentes a propriedades localizadas nas regiões de Araçatuba e Sorocaba. Amostras de sangue com e sem anticoagulante foram colhidas dos ovinos para pesquisa do BTV e de anticorpos contra esse vírus. Nos bovinos foram testadas 2268 partidas de sêmen industrializado de 404 touros, bem como 710 amostras de soro de 329 animais pertencentes a sete Centrais de Inseminação Artificial. A pesquisa de anticorpos dos ovinos e bovinos foi realizada por meio de IDGA e ELISA-CFS e a pesquisa do antígeno foi realizada pela nested RT-PCR. Em 53,85% (7/13) das cabanhas amostradas observou-se pelo menos um animal positivo, o que representou 5,01% (27/538) de ocorrência de animais virêmicos, considerando o total de ovinos estudados pela nested RT-PCR. Acredita-se que a detecção deste grande número de animais com viremia deve-se à escolha de ovinos jovens, mais susceptíveis a infecção, e da época da colheita, que foi realizada em período quente e chuvoso, com temperatura média variando de 21,3 a 26,3°C e média de precipitação 93,2 a 143,3 mm, fatores estes favoráveis à proliferação do vetor. Houve concordância moderada ($k=0,519$) quando comparada a soropositividade de ovinos pela IDGA-13,75% (72/538) com ELISA-CFS- 19,33% (104/538). A alta frequência de touros portadores de anticorpos contra língua 74,16% (244/329), pode explicar detecção de apenas uma partida de sêmen bovino positiva em relação ao total de partidas analisadas, 0,044% (1/2269). Isso indica que bovinos com idade superior a dois anos já se infectaram apresentando risco menor de eliminação do vírus pelo sêmen, pois já soroconverteram ao sorotipo circulante na região. A contribuição desse trabalho é extremamente importante, pois detecta alta ocorrência de ovinos virêmicos, sem sinais clínicos, instigando os pesquisadores a avaliarem o impacto dessa doença no Brasil. As amostras de BTV obtidas neste estudo permitirão o planejamento de outros projetos com a finalidade de isolamento do vírus em ovo embrionado de galinha (OEG) e formação de banco viral, para posteriores estudos de caracterização. A carência de dados sobre os sorotipos circulantes e sua distribuição nas diferentes regiões do Brasil impossibilita ações diretas sobre o foco dos problemas que conseqüentemente impede medidas rápidas para restabelecimento do controle.

Palavras Chave: BTV, Sangue, Sêmen, nested RT-PCR, IDGA, ELISA-CFS

Abstract

The occurrence of bluetongue in sheep of the state of São Paulo and in cattle from Artificial Insemination Centers of southeastern Brazil was analyzed by means of molecular and serological techniques. Thirteen sheep herds were evaluated, in a total of 538 animals, 3 to 7 months old, from farms located in Araçatuba and Sorocaba regions. Blood samples from the sheeps were collected with and without anticoagulants and were analyzed for the presence of the virus and antibodies. In bovines there were evaluated, 2268 processed semen batches from 404 bulls and 710 serum samples from 329 animals, collected of seven Artificial Insemination Centers. Antibodies research in sheep and cattle was carried out by AGID and ELISA-SFC and BTV detection was performed using nested RT-PCR. Positive animals were observed in 53.85% (7/13) of the sheep herds, a rate equal to 5.01% (27/538) of viraemic animals, considering the total of sheep analyzed by RT-PCR. Detection of this large number of animals in viraemia may be due to the fact that young animals, which are more susceptible to infection, were chosen to be analyzed, as well as to the moment when samples were collected, hot and rainy period, favorable to proliferation of the vectors. Mean temperatures ranged from 21.3 to 26.3°C and mean precipitation ranged from 93.2 to 143.3 mm. Comparison of seropositive results in sheep obtained with AGID (13.75%; 72/538) and ELISA-SFC (19.33%; 104/538) showed moderate degree of agreement ($k=0.519$). The high rate of animals with antibodies 74,16% (244/329), can explain only one semen batch was positive for bluetongue virus, representing 0.044% (1/2,269) of the total of batches analyzed. This result indicated that bovines over two years of age show lower risk of elimination of virus by semen, because they have already seroconverted to the serotype circulating in the region. This study gives an extremely important contribution to the knowledge on the disease in Brazil, because it detected high rates of viraemic, asymptomatic sheep. These results should stimulate researchers to evaluate the impact of the disease in Brazil. BTV samples obtained in this study will make it possible to design other projects in order to isolate the virus in embryonated chicken eggs (ECE), and to establish a viral bank for further characterization studies. Lack of data on circulating serotypes and their distribution in different Brazilian regions make it difficult to determine direct actions on the foci of the problems and consequently prevents that quick measures are determined to reestablish control of the disease.

Keywords: BTV, blood, semen, nested RT-PCR, AGID, ELISA-SFC

Lista de Abreviaturas

Ac - Anticorpos

AcM - Anticorpo monoclonal

BHK - Linhagem celular de rins de hamster

BTV – Vírus da língua azul

DO - Densidade óptica

dsRNA - Segmentos de RNA fita dupla

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

ELISA-C - ELISA competitivo

ELISA-CFS - ELISA de competição da fase sólida

ELISA-I - ELISA indireto

HA - Hemaglutinação

IDGA - Imunodifusão em Gel de Ágar

IgG - Imunoglobulina G

LA - Língua azul

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

OEG - Ovo embrionado de galinha

OPD - Orto-fenil-diamina

PBS - Tampão Salina Fosfatada

PCR - Reação de polimerização em cadeia do DNA

RIFID - Reação de imunofluorescência indireta

RIP - Rádio Imuno-precipitação

RNA - Ácido ribonucléico

RT-PCR - Reação de polimerização em cadeia do DNA após Transcriptase Reversa

Vero - Linhagem celular de rim do macaco verde

VN - Vírusneutralização

VP - Proteína viral

WB - Western-Blot

Lista de Siglas

EU - União Européia

EUA – Estados Unidos da América

IB - Instituto Biológico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LVB - Laboratório de Vírus de Bovídeos

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mercosul - Mercado Comum do Sul

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

Panaftosa - Centro Pan-Americano de Febre Aftosa

UNESP - Universidade Estadual Paulista

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Porcentagem de animais reagentes para LA nas diferentes espécies estudadas, em diferentes estados brasileiros, nos últimos anos.....	28
Tabela 2 – “Primers” das reações de RT-PCR e nested PCR para LA em amostras de sangue.....	39
Tabela 3 – “Primers” das reações de RT-PCR e nested PCR para LA em amostras de sêmen.....	41
Tabela 4 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes, pela técnica de IDGA, contra o BTV, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	50
Tabela 5 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes, pela técnica de ELISA-CFS, contra o BTV, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	51
Tabela 6 – Comparação dos resultados obtidos entre a técnica de IDGA e ELISA-CFS, em 538 soros de ovinos, testados contra o BTV, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	52
Tabela 7– Distribuição do número e porcentagem de ovinos positivos, pela técnica de nested RT-PCR, para pesquisa do BTV, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	54
Tabela 8– Distribuição do número de ovinos positivos, pela técnica de nested RT-PCR e seus resultados para pesquisa de anticorpos contra o BTV pelas técnicas de IDGA e ELISA-CFS, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	55
Tabela 9– Temperatura média, precipitação média e mês/ano da colheita das amostras de sangue ovino nas treze propriedades selecionadas e suas respectivas cidades, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	57
Tabela 10 - Resultados das análises séricas de touros, colhidas em diferentes períodos, na Central de Inseminação Artificial denominada “C”, para detecção de anticorpos contra o BTV utilizando a técnica de IDGA, 2006-08, São Paulo, SP.....	59
Tabela 11 - Distribuição do número de amostras de sêmen bovino testadas para pesquisa do BTV pela técnica de nested RT-PCR, de acordo com as Centrais de Inseminação Artificial, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....	62

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição dos ovinos reagentes para o BTV, na prova de IDGA e ELISA-CFS, no período de 2007-08, São Paulo, SP.....52

Figura 2 - Detecção do BTV em amostra de sêmen bovino, utilizando nested RT-PCR. 1 e 2- Amostra sêmen positiva para BTV (duplicata), 3- Controle positivo BTV-4, 4- Controle negativo.....61

Lista de Quadros

Quadro 1 – Esquema de colheita, estimando 1% dos animais em viremia.....34

Quadro 2 – Interpretação dos resultados da prova de IDGA.....44

Quadro 3 - Configuração da placa da prova de “screening” do ELISA-CFS e IDGA.....46

Lista de Anexos

Anexo I – Questionário das Propriedades.....	72
Anexo II - Ficha clínica Individual.....	73
Anexo III – Reagentes para prova de ELISA-CFS.....	74

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

LISTA DE ANEXOS

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Amostras Teste	33
3.2. Amostragem e propriedades estudadas	33
3.3. Obtenção das amostras	35
3.4. Questionários	36
3.5. Vírus Padrão	37
3.6. Pesquisa de Antígeno	37
3.7. Pesquisa de Anticorpos	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Pesquisa de Anticorpo dos ovinos	49
4.2. Pesquisa do BTV em sangue ovino pela reação de nested RT-PCR	54
4.3. Pesquisa de Anticorpo em touros residentes em Central de IA	59
4.4. Pesquisa do BTV em sêmen bovino pela reação de nested RT-PCR	61
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7. ANEXOS	72

1. Introdução

De acordo com o Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008), a íngua azul (LA) é uma doença de notificação obrigatória e está incluída na lista de enfermidades infecciosas cujas conseqüências sócio-econômicas podem ser graves e de importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos.

O impacto econômico da LA decorre de restrições impostas por países importadores e também por perdas diretas nos rebanhos afetados. Para movimentação de animais, inclusive entre os países que compõem o Mercosul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai), é obrigatória análise para pesquisa de vírus ou de anticorpos dos animais ou de seus produtos (Resolução MERCOSUL/GMC/RES Nº. 16/05).

Alterações reprodutivas e malformações congênitas estão entre as mais comuns, bem como afecções na boca, casco e tetas, podendo ser facilmente confundida com outras doenças, tais como, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina a vírus, febre aftosa e estomatite vesicular (OIE, 2008).

Apesar da importância econômica, pouco se sabe sobre os sorotipos de LA existentes no Brasil, pois a maioria dos relatos revelam a presença de anticorpos pela Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), que detecta a presença de anticorpos contra orbivírus e pelo ELISA específico para todos sorotipos de LA, indicando apenas que o animal teve contato com o vírus, porém sem especificar os sorotipos. Apenas em duas ocorrências foram isolados e identificados os sorotipos no Brasil: a primeira em 1980 quando foi isolado o BTV-4 de bovinos exportados para o EUA durante a quarentena em Plumb Island (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982) e a segunda em 2002, o sorotipo BTV-12, de ovinos durante um surto de LA no Estado do Paraná (CLAVIJO et al., 2000).

A alta frequência de ocorrência obtida nos estudos sorológicos e poucos relatos de casos clínicos da doença no campo indicam que a infecção pela LA espalha-se pelos rebanhos do país de forma silenciosa. Condições de temperatura e umidade em todo o Brasil favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores, facilitando a endemidade da doença (LOBATO, 1996).

O baixo interesse pela pesquisa nesse assunto, bem como a pouca disponibilidade de laboratórios para realizar o diagnóstico de LA geram como conseqüência, diagnósticos inconclusivos e falta de conhecimento da real situação dessa enfermidade.

Estudos sobre a doença visam fornecer subsídios para a vigilância sanitária, com bases em monitoramento em Centrais de Inseminação Artificial, tendo em vista a prioridade do controle da LA em países que realizam comércio internacional de produtos de origem animal, principalmente para diminuir o risco de introdução de novos sorotipos. Além disso,

fortalecem as ações do laboratório oficial habilitado para diagnósticos de doenças vesiculares, mantendo-o capacitado a realizar técnicas de identificação do ácido nucléico, sorologia, isolamento e sorotipificação para LA, pois essas são importantes no diagnóstico diferencial e para certificação de animais tanto para exportação quanto para importação.

É de extrema importância o diagnóstico da situação da doença no Estado de São Paulo e a caracterização dos sorotipos existentes, considerando o ambiente propício à proliferação do vetor e o intenso comércio internacional de animais e seus produtos.

O Estado de São Paulo, entre 1995 e 2006, observou um crescimento do rebanho ovino da ordem de 75,04% e segundo dados do IBGE (2006) o rebanho paulista é formado por 378.067 ovinos. Já o comércio internacional de material genético, como por exemplo, sêmen bovino se intensificou nos últimos anos devido às melhorias tecnológicas e também por apresentar teoricamente menor risco sanitário do que a importação de animais vivos (STAUD; SILVA, 2008; CARVALHO et al., 2007).

O Brasil tem enorme potencial de produção e exportação de carnes, sêmen e embriões, contudo, diante da proliferação de medidas sanitárias no comércio internacional deve reforçar a confiança junto aos importadores de modo a garantir a segurança das relações comerciais. Nesse sentido, um programa de fiscalização sanitária mais eficiente (na produção, no abate, transporte e comercialização) e investimentos estruturais (laboratórios, pessoal técnico, vacinação, pesquisas, rastreabilidade e acompanhamento das questões sanitárias no comércio multilateral e regional), são elementos indispensáveis para a conquista de novos mercados e o fortalecimento do produto nacional naqueles já conquistados.

Diante deste cenário, torna-se de grande interesse compreender a epidemiologia da doença, avaliar o risco e determinar medidas de controle e prevenção eficientes contra a LA nos rebanhos.

Para controlar a doença e evitar a introdução de novos sorotipos em áreas específicas é essencial que se conheça os sorotipos existentes. Baseado nesse conhecimento será possível fazer a vigilância e evitar as consequências sócio-econômicas.

Os objetivos do trabalho foram:

1. Pesquisa da infecção pelo vírus da língua azul em ovinos:

1.1. Por métodos indiretos

- IDGA e ELISA-CFS em amostras de soro de ovinos com idade entre 3 e 7 meses;
- Correlacionar os resultados dos testes de IDGA e ELISA-CFS.

1.2. Por métodos diretos

- Nested RT-PCR em amostras de sangue de ovinos com idade entre 3 e 7 meses.

2. Pesquisa da infecção pelo vírus da língua azul em touros de Central de inseminação artificial:

2.1. Por métodos indiretos

- IDGA em amostras de soro.

2.2. Por métodos diretos

- Nested RT-PCR em amostras de sêmen de touros de centrais enzooticamente infectadas.

2. Revisão de Literatura

O vírus da língua azul (BTV) é um vírus não envelopado, icosaédrico e pertencente ao gênero *Orbivirus*, um dos seis gêneros da família *Reoviridae*. O genoma viral (18×10^3 kDa) consiste de 10 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) que codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e três não estruturais (NS1 a NS3). A seqüência das proteínas não estruturais é mais conservada entre os sorotipos, enquanto que, das proteínas mais externas, principalmente a VP2 e VP5, presentes no capsídeo viral, são muito variáveis (ROY, P., 1989).

São mundialmente reconhecidos 24 sorotipos do BTV, sorologicamente distintos, denominados BTV-1 a BTV-24, e não se sabe exatamente como estes diferentes sorotipos se manifestam clinicamente, mas é conhecido que apresentam reação cruzada entre si, podendo ser diferenciados por técnicas de soroneutralização ou por intermédio de reações específicas de suas proteínas externas (BATTEN et al., 2008; ROY, 1992).

No Brasil apenas os sorotipos 4 e 12 foram isolados, o primeiro de bovinos exportados para Plumb Island nos EUA (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982) e o segundo de ovinos provenientes de um surto da enfermidade no Estado do Paraná em 2002 (CLAVIJO et al., 2002).

A replicação viral ocorre no citoplasma, mas muitas das etapas desse processo ainda não são conhecidas. Após a entrada do vírus na célula, este é convertido em partículas nucleares (HUISMANS et al., 1987) que transcreve o dsRNA em segmentos mRNAs. Os mRNAs são traduzidos ou utilizados como modelos para a síntese de dsRNA de descendência genômica.

O BTV é bastante estável na presença de proteínas e em sangue mantido sob congelamento -80°C ou inferior, porém instável quando armazenado a temperatura de -20°C . O vírus é sensível ao pH < 6.0 e > 8.0 , aos desinfetantes comuns como compostos fenólicos e iododóforos e as β -propiolactona e pode ser inativado pelo calor a $50^{\circ}\text{C}/3$ horas ou $60^{\circ}\text{C}/15$ minutos (OIE, 2008).

Provavelmente todas as espécies ruminantes são suscetíveis à infecção pelo BTV, podendo este causar doença em ovinos e nos cervídeos, mas raramente causa doença em bovinos, caprinos e na maioria dos ruminantes selvagens (GIBBS; GREINER, 1994; MELLOR, 1996; BREARD et al., 2004).

Esta enfermidade viral em 1905, ainda com etiologia desconhecida, teve o nome proposto de LA devido à cianose observada na língua e na mucosa oral dos animais doentes. A incidência da doença clínica é altamente variável, a taxa de mortalidade e a

severidade dos sinais clínicos são influenciadas pela espécie, raça, idade e pela condição de saúde do animal infectado, pelo sorotipo e por interações com o meio ambiente (MCLACHLAN, 1994).

Nos ovinos, a LA pode se apresentar como uma doença severa, caracterizada por lesões inflamatórias em tecidos vascularizados como mucosas e bandas coronárias. Em contraste, nos bovinos é geralmente caracterizada por uma viremia prolongada e por uma doença branda ou assintomática. Provavelmente menos de 1% dos bovinos infectados apresentam sintomas clínicos após a infecção (LOBATO, 1999).

Os sinais clínicos e as lesões causadas pelo BTV são decorrentes das lesões nas células endoteliais, que como consequência evoluem para a degeneração e necrose do endotélio vascular (MCLACHLAN, 1994). As lesões macroscópicas da LA variam de acordo com o estágio da doença, do sorotipo do vírus infectante e das condições ambientais.

A enfermidade, quando introduzida numa população ovina, pode afetar 50-75% do rebanho, com uma mortalidade de 20-50%. Nesses casos os sinais clínicos caracterizam-se por febre, corrimento nasal muco-purulento ou sanguinolento, salivação, avermelhamento da mucosa oral e edema da língua, focinho, lábios e mucosa oral. Posteriormente observam-se escoriações e úlceras localizadas principalmente nas faces laterais da língua, cianose da mucosa oral e nasal, diarreia que pode ser hemorrágica, dispnéia e perda de lã. Nos bovinos a LA é geralmente caracterizada por uma viremia prolongada que pode chegar a 100 dias e por uma doença cujos principais sintomas são diarreia crônica, aborto, úlceras na cavidade oral e dermatite (GIBBS; GREINER, 1994). Além de aborto, a infecção em vacas prenhes em início de gestação pode levar à má formação congênita, caracterizada por hidrocefalia, microcefalia, cegueira e deformações da mandíbula.

As lesões vesiculares nas regiões interdigitais e nas mucosas de ovinos e bovinos podem ser confundidas com as de febre aftosa, febre catarral maligna, dermatite pustular contagiosa, poxvirus, doença da fronteira, podridão dos cascos e actinobacilose, portanto, o diagnóstico diferencial é de fundamental importância (BRODIE et al., 1998).

Microscopicamente pode-se verificar infiltrado celular inflamatório mononuclear, vacuolização celular, estase sanguínea, hipertrofia das células endoteliais e fragmentação de vasos sanguíneos de pouco calibre (MICHELSEN, 1990). As lesões anátomo-patológicas da LA são decorrentes dos danos causados pelo vírus nos capilares sanguíneos, que resultam em aumento de permeabilidade vascular, edema, hemorragia, trombose, isquemia e necrose das mais variadas estruturas e órgãos (PARSONSON, 1990).

O sítio primário da infecção pelo BTV são as células endoteliais do sistema vascular e células do sistema linfático. Após a primeira replicação nos gânglios linfáticos, o BTV se dissemina para outras regiões secundárias, principalmente pulmões, baço e linfonodos, onde se replica no endotélio e nos fagócitos mononucleares (BARRATT-BOYES;

MACLACHLAN, 1994). A disseminação pode ser por meio dos vasos linfáticos e/ou vasos sanguíneos.

O agente viral pode ser detectado nos eritrócitos, nos quais ele não se replica, mas persiste em invaginações da membrana celular. A associação do BTV infeccioso com os eritrócitos é detectada logo após a infecção (em torno de 24 h) e persiste durante toda a viremia (WHETTER et al., 1989).

Conseqüentemente, a infecção nos ruminantes é caracterizada por uma viremia prolongada, que pode persistir na presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes. Nos ovinos e bovinos, o vírus é encontrado no sangue durante 35 a 60 dias, podendo ser detectado por até 160 dias (KATZ et al., 1994).

Alguns estudos comprovaram que as partículas virais estão associadas com os eritrócitos e neles permanecem protegidas do sistema imune. Além disso, a detecção de RNA viral até 145 dias após a infecção é muito semelhante à vida dos eritrócitos nos ruminantes, desta forma pode-se sugerir que esta interação do vírus com os eritrócitos possibilita os bovinos desempenharem o papel de reservatório natural do BTV (BREWER; MACLACHLAN, 1994). Em outro estudo demonstrou-se que o RNA viral pode ser detectado em sangue de ruminantes infectados por até 111-222 dias (BONNEAU, 2002).

O BTV tem sido encontrado em várias partes do mundo, incluindo África, Europa, Oriente Médio, Austrália, Pacífico Sul, América do Norte e Sul, bem como em algumas regiões da Ásia. Sua distribuição geralmente limitada-se a países localizados nas áreas tropicais e subtropicais, compreendidas entre as latitudes 50°N e 34°S, porém dados recentes demonstram que está expandindo para o hemisfério norte (OIE, 2008).

A LA foi descrita pela primeira vez na África do Sul no final do século XVIII em ovinos importados. Em 1902, Hutchen mencionou a doença como "epizootia catarral das ovelhas", mas nomeada como "língua azul", em 1905 (BREARD, 2004). Em 1918, a doença já tinha sido descrita na África Ocidental e em vários outros países da África Subsaariana (TOMORI et al., 1992).

Mundialmente o BTV está presente nas áreas entre as latitudes 40° N e 35° S, embora em algumas partes do oeste da América do Norte e China possa ser encontrado em áreas localizadas a 50° N (KIRKLAND et al., 2002).

A LA está se tornando um problema cada vez maior na Europa, onde a União Européia (EU) tem financiado programas de vacinação contra a doença, além de tomar várias outras medidas de controle. Disseminada por mosquitos, essa enfermidade anteriormente tendia a ocorrer mais em regiões do Sul da UE até 2006, quando passou a se mover para os países do Norte (OIE, 2008).

Desde 1998, pelo menos seis sorotipos distintos do vírus da LA (1, 2, 4, 8, 9, 16) estão presentes na Europa. Em Agosto de 2006, o sorotipo BTV-8 foi detectado nos Países

Baixos, tendo sido o primeiro relato do BTV no Norte Europeu, antes de se propagar na Alemanha, Bélgica e nordeste da França, gerando um total de 2.297 casos da doença no norte da Europa durante todo ano de 2006. No ano de 2007, a Europa apresentou um total de 40.931 casos (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008).

Na França a propagação do BTV-8 já foi notificada em 15.253 animais, apenas no sul do país a doença não foi detectada. A LA também reapareceu, em 2007, na Bélgica (6.661 casos), Alemanha (11.487 casos) e nos Países Baixos (5.798 casos), e se propagou para o Luxemburgo (1.315 casos), Dinamarca (01 caso), Suíça (05 casos) e Reino Unido (65 casos). No ano de 2007, um número significativo de animais infectados com LA (BTV-8) de origem africana foram importado para a Itália. Em janeiro de 2008 animais infectados foram detectados na Espanha e também na Irlanda do Norte, e o surto foi rapidamente contido pelo abate de todos os infectados e seus contactantes (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008).

A doença se tornou uma ameaça na Europa e também nos Estados Unidos onde houve recente detecção de oito novos sorotipos de LA. A disseminação da doença em novas regiões (detectada primeiramente na Europa) pode ser um fenômeno mundial, provavelmente como consequência das mudanças climáticas (JOHNSON et al., 2006).

Em 2008, a Austrália notificou à Organização Mundial de Saúde Animal sete casos (7/1024) de LA em bovinos sem manifestação clínica. Esse foi o primeiro relato de BTV-2 no país, sendo que os sorotipos 1,3,7,9,15,16,20,21 e 23 já haviam sido isolados em bovinos na região Norte (OIE, 2008).

Na América do Sul, onze dos treze países possuem seus territórios localizados na área de risco de ocorrência da LA. No Chile, bovinos e ovinos soropositivos foram detectados em 1985. Na Argentina foram realizados dois inquéritos sorológicos para determinar a distribuição do BTV e fatores climáticos como temperatura e precipitação foram considerados para o plano de amostragem. No primeiro inquérito, realizado no período de 1995 a 1996, foram analisadas 1.325 amostras de soro de bovinos correspondentes à região Nordeste e os resultados indicaram 39,8% animais reagentes, enquanto que em 1998, no segundo levantamento sorológico, foram examinadas 1.499 amostras de bovinos e 746 amostras de ovinos, onde apenas os animais da província de Misiones apresentaram anticorpos contra o BTV, bovinos 50,4% (125/248) e ovinos 95% (19/20) (LAGER, 2004).

Grande parte do território brasileiro encontra-se inserido dentro da zona enzoótica (GIBBS; GREINER, 1994). Segundo Lobato (1999), a primeira referência de LA no Brasil data de 1978, quando foi reportado à Organização Mundial de Saúde Animal a primeira evidência sorológica da ocorrência dessa doença no país. Esse relato representou também a primeira evidência do BTV na América do Sul (LAGER, 2004). Em 1980 ocorreu o primeiro isolamento do BTV sorotipo 4 em bovinos originários do Brasil, que foram exportados para

os Estados Unidos, sendo que 13,3% (8/60) produziram anticorpos contra o BTV durante o período de quarentena no país de destino e foram sacrificados (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982).

A partir dessa data, vários levantamentos sorológicos incluindo diferentes espécies de ruminantes domésticos têm evidenciado a presença de anticorpos para o vírus em vários Estados brasileiros, incluindo Minas Gerais (CASTRO et al., 1992; LAGE et al., 1996; LOBATO et al., 2001), Rio de Janeiro (CUNHA et al., 1982), São Paulo (NOGUEIRA et al., 2008), Santa Catarina (CUNHA et al., 1987), Sergipe (MELO et al., 1999), Paraíba (ALVES et al., 2008) entre outros, sem contudo, ser detectado sintomas da doença.

Em 2001 foi confirmado um foco de LA no Estado do Paraná envolvendo 130 ovinos, quatro caprinos e 70 bovinos sororeagentes. Desses animais, oito ovinos e um caprino apresentaram sinais clínicos da doença (LAENDER, 2002; LAGER, 2004), sendo a primeira confirmação da manifestação clínica no país e na América do Sul. Sangue e tecidos de animais com infectados foram utilizados pelo Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (Panaftosa) para o isolamento do vírus e confirmado o envolvimento do sorotipo 12 do BTV no referido surto (CLAVIJO et al., 2002). Em 2002, foram notificados outros três focos da doença nesse mesmo Estado, um acometendo caprinos e outros dois envolvendo caprinos e ovinos (LAGER, 2004).

A LA é uma doença infecciosa não contagiosa, transmitida principalmente por dípteros do gênero *Culicoides*, no qual cerca de 1250 espécies já foram identificadas (BORKENT; WIRTH, 1997), mas apenas 17 estão relacionadas com a transmissão do BTV (MELLOR, 1990). As principais espécies transmissoras do BTV são *C. actoni* Smith e *C. fulvus* Sen & Das Gupta (Austrália, leste e sudeste da Ásia), *C. brevitarsis* Kieffer e *C. wadai* Kitaoka (Austrália e sudeste da Ásia) e *C. imicola* Kieffer (África, países do mediterrâneo, sul e leste da Ásia).

Na América Central e América do Sul, *C. insignis* Lutz e *C. pusillus* Lutz parecem ser os principais vetores do BTV, sendo que os sorotipos 2, 3 e 6 já foram detectados a partir de *C. insignis*, e os sorotipos 3 e 4 a partir do *C. pusillus* (GREINER et al., 1985; KRAMER et al., 1985; MO et al., 1994). No Brasil, estudos associando os *Culicoides* à transmissão do vírus não foram feitos até o presente.

Devido à transmissão da LA depender dos vetores, a epidemiologia da doença consiste em uma interação complexa e dinâmica envolvendo o hospedeiro, os diferentes sorotipos virais, os vetores, o clima e suas inter-relações. A distribuição do BTV está restrita às áreas onde estão presentes espécies competentes do vetor e número suficiente de hospedeiros susceptíveis, portanto a transmissão da doença está limitada ao período do ano em que as condições climáticas favorecem o aumento da população do vetor e a atividade (vôo e repasto sanguíneo) dos insetos (WARD et al., 1994; MELLOR, 1996).

Os *Culicoides* se infectam com o BTV quando ingerem sangue de um hospedeiro em período de viremia. Apenas as fêmeas são hematófagas e para a conclusão de um ciclo ovariano precisam apenas um repasto sangüíneo. Com isso, o pico de atividade desses insetos está relacionado com seu ciclo reprodutivo. A alimentação ocorre no período noturno e as temperaturas ótimas para a atividade estão entre 13 e 35°C, sendo que temperaturas elevadas diminuem o tempo necessário para a conclusão de um ciclo ovariano (WITTMANN; BAYLIS, 2000).

O calor é necessário para a eclosão dos ovos e para o desenvolvimento das larvas (WITTMANN; BAYLIS, 2000). A variação da temperatura provavelmente é o principal fator relacionado à oscilação populacional do vetor, altas temperaturas favorecem a reprodução do vetor, enquanto que as excessivamente altas podem reduzir a sobrevivência de vetores adultos (WARD; THURMOND, 1995).

Outro fator importante para o desenvolvimento do vetor é a umidade, necessária ao desenvolvimento das fases larval e de pupa dos *Culicoides*, sendo os ovos depositados em ambientes alagados e com alto grau de matéria orgânica, ou em águas limpas de alta salinidade ou alcalinidade. São locais de eleição para a reprodução desses vetores pântanos, terrenos irrigados, cochos, cavidades de árvores, frutas em putrefação, solo úmido, áreas lamacentas e áreas de escoamento fecal ao redor das fazendas (LOBATO, 1999; LAENDER, 2002).

Diante dos fatos citados acima conclui-se que primavera e verão favorecem a reprodução e a atividade dos *Culicoides* e, conseqüentemente, a maior transmissão do BTV; de outro modo, sua população tende a diminuir no final do outono e inverno, quando a temperatura e a umidade são mais baixas, sendo a LA, por este motivo, uma doença de caráter sazonal em muitas regiões (GIBBS; GREINER, 1994).

A velocidade e direção dos ventos é outro fator climático que influencia na dispersão aérea dos *Culicoides* e algumas espécies podem ser carregadas pelo vento por 5 a 6 km de distância (WARD, 1994).

Alguns estudos propõem que, além dos *Culicoides*, existem outros vetores biológicos, podendo a transmissão mecânica do BTV ser realizada pelo *Melophagus ovinos* (piolho do ovino), pelo carrapato *Ornithodoros coriaceus* e por outros mosquitos como o *Aedes lineatopennis* e *Anopheles vagus* (RADOSTIS et al., 2002).

Quanto à transmissão venérea do BTV, já foi relatada a contaminação de vacas susceptíveis por sêmen contaminado. Entretanto, pesquisas apontam que a presença do vírus no sêmen de touros é restrita ao período virêmico, coincidindo, normalmente, com o pico da viremia. Trabalhos recentes indicam que a excreção do vírus pelo sêmen só ocorre se este estiver com sangue. Em um estudo, Bowen et al. (1985) inocularam o BTV em vinte touros com objetivo de estudar a frequência, duração e patogênese da eliminação viral, o

vírus foi isolado em 10,49% (19/181) dos ejaculados examinados durante o período de viremia e em nenhum de 79 ejaculados após a viremia.

O diagnóstico de rotina do BTV é baseado principalmente em métodos sorológicos, moleculares e de isolamento viral (OIE, 2008). Os primeiros ensaios sorológicos foram realizados pelas técnicas de inibição da hemaglutinação (HI), hemólise em gel e reação de imunofluorescência indireta (RIFID) (WALTON, 1980).

A IDGA e o teste de ELISA têm sido usados na vigilância epidemiológica e para emissão de certificados para comércio internacional de animais e de seus produtos (Manual Padrão para Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, 2008; Resolução MERCOSUL/GMC/RES nº. 16/05). Estes testes são sensíveis e fáceis de executar, detectam anticorpos contra todos os 24 sorotipos da LA, além disso, a IDGA detecta anticorpos contra outros orbivírus estreitamente relacionados (vírus da Doença Equina Africana, vírus da doença hemorrágica epizootica, vírus da encefalose equina e o vírus palyam).

Bovinos e ovinos infectados pelo BTV desenvolvem uma resposta imune humoral frente a uma variedade de diferentes proteínas virais e a neutralização viral é dependente da presença de anticorpos dirigidos à proteína VP2. Epítomos que são responsáveis pela neutralização de uma estirpe do BTV podem existir em uma conformação não-neutralizante em outras estirpes ou sorotipos, além disso, um epítomo neutralizante pode fazer parte de diferentes sorotipos, fato comprovado pelas reações imunológicas cruzadas entre si (RICHARDS et al., 1988; DEMAULA et al., 1993; McLACHLAN, 1994).

A prolongada viremia, que ocorre em ruminantes infectados provavelmente é consequência da associação do vírus com células do sangue, especialmente eritrócitos, que protegem o BTV da neutralização por anticorpos (McLACHLAN et al., 1990).

Barratt-Boyes et al. (1995) demonstraram que os linfonodos responsáveis pela drenagem do sítio da inoculação do agente viral desenvolvem uma resposta imune humoral antes da resposta sistêmica, podendo ser detectados anticorpos nos vasos linfáticos regionais a partir de um linfonodo vários dias antes de sua detecção no soro.

Anticorpos contra o BTV geralmente são detectados no soro de ruminantes infectados 7-28 dias após a inoculação, dependendo do tipo de técnica diagnóstica utilizada (McLACHLAN, 1994).

Vários inquéritos sorológicos foram realizados no Brasil em diferentes espécies de ruminantes domésticos por meio da técnica de IDGA e ELISA. Eles indicam que o vírus está amplamente distribuído em todas as regiões estudadas como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagem de animais soropositivos para LA nas diferentes espécies estudadas, em diferentes Estados brasileiros, nos últimos anos.

Autores	Ano	Estado / Região	% de Reagentes	Técnica utilizada	Espécie
Moreira et al.	1980	MG	74 (427/577)	IDGA	Bovina
Cunha et al.	1982	RJ	41 (227/553)	IDGA	Bovina
Abreu	1982	RR	16 (236/1472)	IDGA	Bovina
		AM	26 (94/360)	IDGA	Bovina
		PA	33 (119/360)	IDGA	Bovina
		PA	21 (86/360)	IDGA	Bovina
		PA	21 (86/360)	IDGA	Bovina
Silva et al.	1988	MG	6 (20/340)	IDGA	Caprina
Cunha et al.	1987	PR	20 (21/106)	IDGA	Bovina
		SP	54 (116/214)	IDGA	Bovina
		SC	37 (64/174)	IDGA	Bovina
		RS	1 (5/409)	IDGA	Bovina
Cunha et al.	1988	RJ	44 (261/593)	IDGA	Caprina
		RJ	24 (8/33)	IDGA	Ovina
Castro et al.	1992	MG	76 (343/451)	IDGA	Bovina
Arita et al.	1992	SP	53 (38/72)	IDGA	Ovina
Costa	2000	RS	0,15 (2/1341)	IDGA	Ovina
Costa	2000	RS	0,6 (8/1272)	IDGA	Bovina
Lobato et al.	2001	MG	42 (623/1484)	IDGA	Caprina
		MG	65 (408/628)	IDGA	Ovina
Silva	2002	CE	31 (578/1865)	IDGA	Caprina
		MG	54 (772/1429)	IDGA	Ovina
Nogueira	2008	SP	65 (651/1002)*	IDGA	Ovina
Alves et al.	2008	PB	4,1 (27/506)*	IDGA	Ovina

Adaptado: LOBATO, 1999

*Amostragem representativa da população estudada

O teste de IDGA para detectar anticorpos contra BTV é simples de se executar e o antígeno usado no ensaio é relativamente fácil de produzir. Desde 1982, foi preconizado como teste padrão para movimentação internacional de ruminantes, entretanto, uma das desvantagens é sua falta de especificidade, pois pode detectar anticorpos de outros orbivírus (OIE, 2008).

Em 1989, Afshar et al. compararam três testes para a detecção de anticorpos séricos contra o BTV: ELISA competitivo (ELISA-C), grupo específico de anticorpos monoclonais contra o BTV, ELISA indireto (ELISA-I) e IDGA. A especificidade do ELISA-C foi superior a 99,92%, do ELISA-I 99,85% e do IDGA de 99,0%, nos bovinos. Nos ovinos a especificidade do ELISA-C foi de 99,63% também superior ao teste IDGA.

Reddington et al. (1991) concluíram que a sensibilidade do ELISA-C é comparável a do western-Blot (WB), da rádio imuno-precipitação (RIP) e da vírusneutralização (VN), esses três métodos são altamente sensíveis e específicos para a detecção de anticorpos anti-polipeptídeos virais específicos, mas, por serem muito trabalhosos, não são apropriados para o uso de diagnóstico de rotina.

Pandolfi (1999) detectou por meio do ELISA competitivo (ELISA-C) a ocorrência de 87% (54/62) ovinos reagentes, pertencentes ao rebanho da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária do Campus de Jaboticabal – UNESP.

Em um estudo mais recente na Índia foram pesquisados anticorpos contra o BTV em amostras de soro de ovinos e caprinos, naturalmente infectados, provenientes de diferentes distritos do Estado de Rajasthan, Índia. Das 408 amostras séricas de ovinos foram selecionadas 178 e submetidas aos testes de IDGA e ELISA-C, com objetivo de determinar a eficácia comparativa entre os dois testes de diagnóstico. Os resultados demonstraram maior número de amostras soropositivas no ELISA-C 30,3% (54/178), contra 9,5% (17/178) no teste de IDGA, indicando que o ELISA-C foi mais sensível quando comparado com o IDGA (SHRINGI; SHRINGI 2005)

Resultados propostos por Velic et al. 2004 também indicam que o ELISA-C foi superior à do IDGA na detecção de anticorpos anti-BTV em ovinos.

Uma das maneiras para detecção dos sorotipos prevalentes em determinada área é a utilização das técnicas de isolamento e identificação do vírus. Um dos métodos mais empregados para este fim consiste na inoculação de material suspeito por via intravenosa em ovos embrionados de galinha (OEG), seguida de inoculação *in vitro* em células BHK-21. Células sanguíneas colhidas no início da infecção e “pool” de insetos vetores são os materiais de escolha para o isolamento do BTV.

O primeiro relato de isolamento do BTV usando a técnica de inoculação em OEG foi feito por Manson et al. em 1941. Goldsmit; Barzilai (1968) usaram a via intravenosa para a inoculação do vírus em OEG e relataram uma sensibilidade de aproximadamente 1000 vezes maior quando comparada com a via de inoculação através do saco vitelínico.

Em 1992, Babu et al. isolaram o BTV de ovinos soropositivos a partir de hemácias lavadas, inoculadas pela via intravenosa em OEG incubados a 33,5°C. A cada passagem, os embriões que morreram ou que demonstraram lesões (hemorragia e edema) foram processados e inoculados em células BHK-21 e Vero.

O isolamento do BTV, para ser bem sucedido, depende primeiramente da presença de concentrações adequadas de vírus e infraestrutura laboratorial para cultivo de células e biotério, bem como técnicos capacitados. O sangue coletado com anticoagulante durante a fase de viremia da doença é a amostra de eleição, entretanto outros materiais como sêmen e tecidos podem ser utilizados (CLAVIJO et al, 2002).

O armazenamento de amostras de sangue que não sofreram o processo de lavagem de hemácias deve ser evitado, pois reduzirá a possibilidade de sucesso no isolamento, pela presença de anticorpos na amostra de sangue, que podem neutralizar o vírus (CLAVIJO et al, 2002).

A escolha da linhagem celular para o isolamento do BTV deve ser avaliada com cuidado, pois seu sucesso dependerá de como a cultura celular suporta a multiplicação do vírus. As linhagens de células do tipo BHK-21 e Vero são altamente susceptíveis, com os sinais de efeito citopático aparecendo em torno de 2-5 dias após a inoculação (WECHSLER; HOLLAND, 1988).

A PCR tem sido utilizada para detectar a presença do ácido nucléico viral em amostras de campo. Com essa técnica, o vírus pode ser detectado em amostras de sêmen de animais em viremia e de sangue de ruminantes por pelo menos 30 dias, e algumas vezes 90 dias após infecção, sendo técnica sensível para indicar a presença do RNA viral (BILLINIS et al., 2001).

Oligonucleotídeos derivados de genes altamente conservados, tais como VP3, VP6, VP7, NS1 e NS3 podem ser usados para triagem de animais positivos, tendo em vista que reagem com todos os membros do sorogrupo do BTV (AGUERO et al., 2002; WILSON, et al., 2000).

Para o controle da LA, cada país necessita desenvolver sua própria avaliação dos fatores de risco. De acordo com a OIE, para importação de animais susceptíveis e seus produtos (sêmen, óvulos, embriões, etc.) as medidas preventivas para entrada do BTV são o controle de importação animal e quarentena, acompanhada de duas ou três sorologias (OIE, 2008).

O passo fundamental para impedir a entrada do vírus em um país livre da LA é identificar quais sorotipos existem no país exportador e se existem *Culicoides* competentes para esses sorotipos no país importador. Entretanto, a infecção pela LA apresenta um caráter “silencioso”, ou seja, na grande maioria os animais não manifestam sintomatologia clínica aparente. Em regiões onde a LA é endêmica, a possibilidade de erradicação é praticamente nula, por este motivo, as medidas de controle baseiam-se na ação sobre o vetor, na vacinação e nas barreiras criadas para evitar a movimentação de animais e seus subprodutos (KONRAD et al., 2003).

Para o controle do vetor são necessárias modificações ambientais que visam a eliminação dos sítios de reprodução dos mosquitos, como a eliminação de locais com acúmulo de água. Com o mesmo objetivo, também podem ser utilizados inseticidas de uso externo em ambientes como estábulos, porém essas práticas têm efeito temporário, além de poderem causar problemas ambientais e serem de alto custo. Para a utilização dessas medidas é necessário o conhecimento do ciclo biológico, da população e da dinâmica do vetor na região e aplicação em época certa e com boas condições climáticas. (LOBATO, 1999; BREARD et al., 2004).

A vacinação de espécies susceptíveis é a mais eficiente forma de controlar a doença (BREARD et al., 2004). Há uma variedade de vacinas produzidas com diferentes sorotipos do BTV, viva, modificadas por engenharia genética, como atenuadas por sucessivas passagens em sistemas *in vivo* e inativadas, disponíveis no mercado internacional (África do Sul, Austrália, Europa) (MURRAY; EATON, 2006; OIE, 2008). Na África do Sul, vacinas atenuadas tem sido utilizadas por mais de 40 anos e são conhecidas por induzir uma efetiva e duradoura imunidade (ERASMUS, 1975).

A vacinação visa diminuir as perdas econômicas e reduzir o número de animais susceptíveis e, por conseguinte, o número de animais virêmicos, sendo ideal que se conheça os sorotipos existentes na região e que esses sejam incluídos na vacina. Os entraves para produção de vacinas são a existência de muitos sorotipos que ocorrem ao mesmo tempo em uma determinada região e a interferência de anticorpos vacinais no monitoramento da doença (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008).

A primeira vacina inativada que foi desenvolvida e utilizada a campo após o surgimento da LA na Europa foi a vacina contra o BTV-2. Posteriormente, uma vacina monovalente BTV-4 e uma bivalente BTV-2 e BTV-4 foram desenvolvidas e utilizadas na Córsega, Espanha, Portugal e Itália. Outras vacinas inativadas recentemente estão em processo de desenvolvimento (SAVINI et al., 2008). Vacinas inativadas podem gerar uma imunidade segura e protetora, se devidamente empregadas. No entanto, uma única dose geralmente é insuficiente para proporcionar uma imunidade duradoura por vários meses, especialmente em bovinos. As desvantagens incluem seu elevado custo de produção (vacinação requer grandes quantidades de antígeno, adjuvante e inativante) e a necessidade de um reforço vacinal (VERWOERD; ERASMUS, 2004).

Vacinas atenuadas são baratas de produzir em grandes quantidades, elas geram imunidade protetora após uma única inoculação e têm se apresentado eficazes na prevenção da doença clínica da LA (DUNGU, et al., 2004). No entanto, possuem alguns inconvenientes, por representarem risco de teratogenia se administrada em ovelhas em início de gestação. Também tem sido considerada a possibilidade da ocorrência de recombinação gênica entre cepas do vírus vacinal e de campo, resultando em novos tipos

virais que podem induzir variações nas características conhecidas de virulência ou expressar novas propriedades antigênicas (BREARD et al., 2004). Portanto, vacinas inativadas são preferidas, pois o vírus inativado elimina os riscos de transmissão vetorial, a reversão da virulência e o aparecimento de anomalias fetais (OIE, 2008).

O comércio de animais e de material genético é imprescindível para manutenção ou aumento da produtividade pecuária, mas não está isento de riscos. Em decisões envolvendo importações ou exportações, normalmente é complicado fazer acordos sanitários que ofereçam risco mínimo. Geralmente os países livres ou conhecedores da dinâmica da infecção pelo BTV restringem as exportações brasileiras com base em barreiras econômicas e sanitárias, proibindo a importação de quaisquer ruminantes de países onde a doença ocorra, visando desta forma evitar a introdução da doença ou de novos sorotipos (CARVALHO et al., 2007; OIE, 2008).

A comercialização de sêmen bovino para áreas de baixo risco de ocorrência de LA só é permitida após sorodiagnóstico ou pesquisa de vírus em sangue dos touros doadores (OIE, 2008).

3. Material e Métodos

3.1 Amostras Teste

Para realização deste estudo, foram utilizadas amostras de soro e sangue de ovinos de ambos os sexos, com idade entre 3 a 7 meses, pertencentes a propriedades localizadas em cidades da região de Araçatuba e Sorocaba, Estado de São Paulo, Brasil.

Foram também analisadas amostras de sêmen bovino industrializado, provenientes de Centrais de Inseminação Artificial, enzooticamente infectadas com o BTV (cerca de 80% de animais reagentes, dados não publicados), da região Sudeste do Brasil.

Tanto as Centrais como as propriedades selecionadas para este estudo pertenciam a regiões com clima quente e úmido na maior parte do ano, condições essas que favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores *Culicoides spp* (Lobato, 1996).

3.2 Amostragem e propriedades estudadas

As propriedades visitadas na Região de Araçatuba foram selecionadas a partir da constatação da soroprevalência de LA em 65% nos ovinos adultos, pela análise sérica por IDGA (NOGUEIRA, 2008) e na região de Sorocaba em cerca de 50% (dados não apresentados).

Como o objetivo principal do estudo foi a detecção da infecção, determinou-se uma amostragem representativa da população para encontrar pelo menos um animal virêmico, considerando de forma empírica que na população de animais jovens (expostos ao risco) 1% sejam virêmicos. Foram colhidas amostras de sangue dos animais com idade entre 3 a 7 meses, que são os mais suscetíveis e com maior probabilidade de estarem em viremia.

O cálculo para determinação do número de amostras de cada propriedade (soro e sangue), colhidas dos ovinos na faixa etária desejada, foi obtido utilizando a seguinte fórmula (CANNON; ROE, 1982; MARTIN et al., 1992; NOORDHUIZEN, et al., 1997):

$$[1-(1-C)^{1/(D*SENS)}] * [M-(D*SENS-1)/2]$$

Onde:

C = grau de confiança

M = nº. de unidades (animais/rebanhos) em risco

D = nº. de unidades com doença/infecção

SENS = sensibilidade do teste

(*) sinal de multiplicação

O quadro abaixo (Quadro 1) mostra uma projeção dos cálculos, adotando como sensibilidade do teste de 0,95% e o grau de confiança de 0,95%.

Quadro 1 – Esquema de colheita, estimando 1% dos animais em viremia

População em Risco (nº. de animais na faixa etária 3 a 7 meses presentes na propriedade)	Nº. de animais coletados (considerando prevalência mínima de 1%)
05	05
25	25
50	50
100	96
200	158
400	217
750	256
1000	269
1500	283
2000	290

Os critérios para selecionar as propriedades de ovinos foram:

- Propriedade que tenha apresentado aproximadamente 50% de ovinos adultos testados reagentes para anticorpos contra o BTV;
- Oferecer condições para colheita das amostras de sangue;
- Permissão e compromisso dos proprietários para colaborarem no projeto.

3.3 Obtenção das amostras

3.3.1 Sangue total para pesquisa do vírus

As amostras de sangue utilizadas para a pesquisa do BTV pela prova de nested RT-PCR foram colhidas de ovinos com idade entre 3 e 7 meses e de ambos os sexos. Esta faixa etária foi escolhida por apresentar maior exposição ao risco, devido à queda dos anticorpos passivos, com isso aumenta a probabilidade de ocorrer infecção natural e, conseqüentemente, animais virêmicos.

A colheita foi realizada por punção da veia jugular, após antissepsia do local, utilizando tubos a vácuo contendo como anticoagulante o citrato.

Foram analisadas 538 amostras de sangue, provenientes de 13 propriedades, denominadas neste estudo de A a I.

Após a colheita, o sangue total foi processado conforme o item abaixo.

3.3.1.1 Lavagem de Hemácias

A lavagem das hemácias tem como objetivo eliminar os anticorpos contra o BTV que possam neutralizar o vírus.

O procedimento de lavagem foi realizado de acordo com as recomendações preconizadas no Manual Padrão para Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, 2008. O sangue foi centrifugado a 600xg durante 10 minutos a 4°C, o plasma retirado e as células sanguíneas lavadas e ressuspensas em igual volume de PBS (Tampão Salina Fosfatada) estéril, o sobrenadante resultante desta etapa foi descartado, essa etapa se repetiu por mais uma vez e por fim foram retirados 400 µL da hemácia (precipitado) e distribuídos em tubos eppendorfs® de 1,7 mL previamente identificados. As alíquotas foram acondicionadas a uma temperatura de -80 °C até a realização dos testes.

Uma alíquota foi destinada para o teste de nested RT-PCR, descrita no item 3.6.1 e outra armazenada a -80°C para uma posterior etapa do estudo que será o isolamento viral em ovos embrionados de galinha das amostras positivas neste teste.

3.3.2 Amostras de soro

Soro sanguíneo foi utilizado para a pesquisa de anticorpos contra o BTV por IDGA e ELISA de competição de fase sólida, objetivando a inclusão das propriedades de Sorocaba que ainda não haviam sido examinadas, bem como dos animais alvo desta pesquisa.

As colheitas de sangue foram realizadas com tubos de ensaio a vácuo sem anticoagulante após antissepsia local, por punção da veia jugular.

O sangue obtido foi mantido em repouso a temperatura ambiente até a completa retração do coágulo, para a separação da fração sérica. Para melhor separação do soro, este foi centrifugação a 600xg durante 5 minutos. Após esta centrifugação o soro foi transferido para tubos eppendorfs[®] de 1,7 mL, devidamente identificados e armazenados a -20°C até a realização dos testes.

Foram analisadas 538 amostras séricas, provenientes de 13 propriedades, denominadas neste estudo de A a I.

3.3.3 Amostras de sêmen

As amostras de sêmen bovino industrializado utilizadas para a pesquisa do BTV pela prova de nested RT-PCR foram provenientes de Centrais de Inseminação Artificial de diferentes Estados da região Sudeste, que enviam regularmente ao Laboratório de Viroses de Bovídeos este material para controle sanitário do rebanho.

Foram analisadas 2269 partidas de sêmen bovino, coletadas de 404 touros provenientes de sete Centrais de Inseminação Artificial, denominadas neste estudo de A a G.

3.4 Questionários

Todas as propriedades visitadas foram submetidas a um questionário (Anexo I), com o objetivo de avaliar os fatores de risco para a LA e buscando desta forma uma correlação entre as características ambientais e a prevalência da enfermidade.

Outro questionário (Anexo II) foi elaborado para o caso de se encontrar animais com sintomatologia clínica sugestiva de LA, e os dados clínicos como frequência cardíaca,

respiratória, temperatura, atraso de crescimento, lesão na língua, palato, gengiva, lábios, mucosa oral, coronite, relutância ao andar, edema facial, anotados em ficha clínica individual.

3.5 Vírus Padrão

Para contaminação experimental de amostras de sêmen, sangue e determinação da sensibilidade analítica da reação de nested RT-PCR foi empregado o sorotipo BTV-4, cultivado em células de linhagem Vero e com título $10^{4,7}$ TCID₅₀/mL.

3.6 Pesquisa de Antígeno

3.6.1 Pesquisa do BTV em sangue de ovinos pela reação de nested RT-PCR

3.6.1.1 Determinação da sensibilidade analítica da nested RT-PCR

Para determinação da sensibilidade analítica da nested RT-PCR foi utilizado sangue total colhido com citrato de sódio de bovino sabidamente negativo para o BTV, fato comprovado por métodos diretos (PCR) e indiretos (IDGA e ELISA). As amostras de sangue foram inoculadas experimentalmente com BTV sorotipo 4, título $10^{4,7}$ TCID₅₀/mL, a partir da amostra desse vírus padrão previamente titulada, foram feitas diluições na razão partindo de 10^{-1} até 10^{-10} .

O material extraído a partir de cada diluição décupla pode ser detectado pelo método de nested RT-PCR até a diluição 10^{-4} .

3.6.2.2 Extração do RNA

As amostras de hemácias previamente lavadas (item 3.3.1.1) foram submetidas à extração do RNA viral com o Brazol[®] (LGC Biotecnologia), de acordo com as instruções do fabricante.

Primeiramente foram adicionados 800 µL de água DEPC ao tubo contendo 400 µL de hemácia, este foi centrifugado a 12.000xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante desta etapa foi descartado, adicionaram-se 600 µL de Brazol e agitou-se em vórtex por 15 seg. incubado a 30°C durante 5 min. sob agitação constante (850 rpm). Em seguida foram adicionados 100µL de clorofórmio (Merck[®]), homogeneizados e novamente incubada a temperatura de 30°C por 5 min. A mistura foi centrifugada a 12.000xg a 4°C por 15 min. Após esta etapa, transferiu-se 400µL do sobrenadante (fase aquosa) a novos tubos contendo 500µL de isopropanol (Merck[®]), nesse momento os tubos que continham o precipitado foram descartados.

Estes novos tubos misturados por inversão foram incubados 10 min. os a temperatura de 30°C. Transcorrido esse tempo os tubos foram centrifugados a 12.000xg a 4°C por 10 min. Foi aspirado o sobrenadante cuidadosamente para não desprezar acidentalmente o “pellet”.

O “pellet” obtido foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Merck[®]) e centrifugado a 12.000xg durante 5 min. e novamente lavado com 1 mL de etanol 100%.

Após, o mesmo foi seco ao ar e dissolvido em 50µL de água DEPC (Sigma[®]) incubado a 56°C por 10 min. e estocado a - 70°C até a etapa de amplificação.

3.6.2.3 Oligonucleotídeos (“primers”)

A identificação do BTV foi realizada utilizando “primers” específicos desenhados a partir do segmento 6 do genoma viral (RNA 6), esta seleção foi baseada na observação de que o gene que codifica a proteína NS1 é uma das mais conservadas entre os sorotipos do BTV. As seqüências dos oligonucleotídeos foram obtidas do Manual Padrão para Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, 2008.

A Tabela 3 abaixo mostra os “primers” utilizados nas diferentes reações de RT-PCR e nested PCR para LA.

Tabela 2 – “Primers” das reações de RT-PCR e nested PCR para LA em amostras de sangue.

“Primers”	Posição	Seqüência
RT-PCR		
“Primer” 1	11 - 284	5'- GTTCTCTAGTTGGCAACCACC -3'
“Primer” 2		5'- AAGCCAGACTGTTTCCCGAT -3'
Nested-PCR		
“Primer” 3	170 - 270	5'- GCAGCATTGAGAGAGCGA -3'
“Primer” 4		5'- CCCGATCATACATTGCTTCCT -3'

3.6.2.4 Reações de nested RT-PCR

A reação de PCR foi baseada no protocolo padronizado pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos, seguindo-se as especificações preconizadas no kit comercial Access Quick™ RT-PCR System (PROMEGA), com algumas modificações.

A reação foi realizada num volume total de 25 µL, contendo 12,5 µL Access Quick Master mix 1X (Tris-HCl, KCl, dNTP mix, 3 mM de MgCl₂), 1,25 µL de cada “primers”, 0,5 µL AMV “reverse transcriptase” (5 U/µL), 5 µL de RNA (amostra) e 4,5 µL de “free water Rnase”. Enquanto que para a reação de nested (segunda amplificação), seguiu-se o protocolo preconizado para o kit comercial PCR Master Mix™ (PROMEGA) num volume total de 22 µL, contendo 12,5 µL PCR Master mix (50 u/mL Taq DNA Polymerase; 400 µM de cada DNTP e 3,0 mM MgCl₂), 1,25 µL de cada “primer” e 2 µL de cDNA e 5,0 µL de “free water Rnase”.

As condições de temperatura e ciclos para as reações de síntese do cDNA e posterior amplificação foram:

Primeira amplificação:			Segunda amplificação:		
01 ciclo:	50°C	30 minutos	01 ciclo:	95°C	3 minutos
	95°C	3 minutos			
40 ciclo:	95°C	25 segundos	40 ciclo:	95°C	25 segundos
	58°C	20 segundos		58°C	20 segundos
	74°C	25 segundos		74°C	25 segundos
01 ciclo:	74°C	5 minutos	01 ciclo:	74°C	5 minutos

O produto de cada amplificação foi analisado em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1X e submetido à eletroforese com voltagem constante de 100 V, por 1 hora. A presença de bandas foi evidenciada após coloração com brometo de etídio (5µg/mL) e visualização em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Fermentas[®]). O tamanho esperado do produto da reação de nested RT-PCR foi de 273 pb.

3.6.2 Pesquisa do BTV em sêmen pela reação de nested RT-PCR

3.6.2.1 Determinação da sensibilidade analítica da nested RT-PCR

Para determinação da sensibilidade analítica da nested RT-PCR foi utilizado sêmen *in natura*, sabidamente negativo para o BTV, fato comprovado por métodos diretos (PCR), contaminado experimentalmente com BTV sorotipo 4, título $10^{4,7}$ TCID₅₀/mL. A partir da amostra desse vírus padrão, previamente titulada, foram feitas diluições na razão partindo de 10^{-1} até 10^{-10} .

O material extraído a partir de cada diluição décupla pode ser detectado pelo método de nested RT-PCR até a diluição 10^{-4} .

3.6.2.2 Extração do RNA

As amostras de sêmen *in natura* foram submetidas à extração do RNA viral com o Brazol[®] (LGC Biotecnologia), de acordo com as instruções do fabricante.

Para cada 200 µL de amostra de sêmen foram adicionados 600 µL de Brazol[®] (LGC Biotecnologia) e após agitação em vórtex por 15 seg. foi incubado a 30°C durante 5 min. sob agitação constante (850 rpm). Em seguida foram adicionados 100µL de clorofórmio (Merck[®]), homogeneizados e novamente incubada a temperatura de 30°C por 5 min. A mistura foi centrifugada a 12.000xg a 4°C, por 15 min. Após esta etapa, transferiu-se 400µL do sobrenadante (fase aquosa) a novos tubos contendo 500µL de isopropanol (Merck[®]), nesse momento os tubos que continham o precipitado foram descartados.

Estes novos tubos misturados por inversão foram incubados por 10 min. a temperatura de 30°C. Transcorrido esse tempo os tubos foram centrifugados a 12.000xg a

4°C, por 10 min. Foi aspirado o sobrenadante cuidadosamente para não desprezar acidentalmente o “pellet”.

O “pellet” obtido foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Merck®) e centrifugado a 12.000xg durante 5 min. e novamente lavado com 1 mL de etanol 100%.

Após, o mesmo foi seco ao ar e dissolvido em 50µL de água DEPC (Sigma®) incubado a 56°C por 10 min. e estocado a - 70°C até a etapa de amplificação.

3.6.2.3 Oligonucleotídeos (“primers”)

A identificação do BTV foi realizada utilizando “primers” específicos desenhados a partir do segmento 6 do genoma viral do BTV-11, esta seleção foi baseada na observação de que o gene que codifica a proteína NS1 é uma das mais conservadas entre os sorotipos do BTV (ARADAIB et al., 1998).

A Tabela abaixo mostra os “primers” utilizados nas diferentes reações de RT-PCR e nested PCR para LA.

Tabela 3 – “Primers” das reações de RT-PCR e nested PCR para LA em amostras de sêmen.

“Primers”	Posição	Seqüência
RT-PCR		
“Primer” 1	71-90	5' GCCCTTACTGGATAACAGA 3'
“Primer” 2	841-860	5' ATTCCAGTCCGGTATCGTTC 3'
nested-PCR		
“Primer” 3	311-330	5' TTAACAGGTACGCCTCGATG 3'
“Primer” 4	811-830	5' CCTCGCTCCAGTGTAACAAT 3'

3.7.2.4 Reações de nested RT-PCR

A reação de PCR foi baseada no protocolo padronizado pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos, seguindo-se as especificações preconizadas no kit comercial Access Quick™ RT-PCR System (PROMEGA).

A reação foi realizada num volume total de 20 μL , contendo Access Quick Master mix 1X (Tris-HCl, KCl, dNTP mix, 3 mM de MgCl_2), 0,5 μM de cada primer, 0,5 μL AMV “reverse transcriptase” (5 U/ μL), 2 μL de RNA (amostra) e 6,5 μL de “free water Rnase”. Enquanto que para a reação de nested (segunda amplificação), seguiu-se o protocolo preconizado para o kit comercial PCR Master Mix™ (PROMEGA) num volume total de 25 μL , contendo 12,5 μL PCR Master mix (50 u/mL Taq DNA Polymerase; 400 μM de cada DNTP e 3,0 mM MgCl_2), 0,5 μM de cada “primer” e 2 μL de cDNA e 9,5 μL de “free water Rnase”.

As condições de temperatura e ciclos para as reações de síntese do cDNA e posterior amplificação foram:

Primeira amplificação:			Segunda amplificação:		
01 ciclo:	42°C	50 minutos	01 ciclo:	95°C	2 minutos
	95°C	2 minutos			
40 ciclo:	95°C	30	40 ciclo:	95°C	30
segundos			segundos		
	50°C	30		50°C	30
segundos			segundos		
	72°C	1 minuto		72°C	1 minuto
			01 ciclo:	72°C	5 minutos

O produto de cada amplificação foi analisado em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1X e submetido à eletroforese com voltagem constante de 100 V, por 1 hora. A presença de bandas foi evidenciada após coloração com brometo de etídio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualização em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Fermentas®). O tamanho esperado do produto da reação de nested RT-PCR é de 520 pb.

3.7 Pesquisa de Anticorpos

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico – SP, autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para realização do diagnóstico de LA.

As amostras de soro dos ovinos foram submetidas ao teste de ELISA de competição da fase sólida (ELISA-CFS) e de IDGA, ambos com reagentes (Kits) fornecidos pelo Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (Panaftosa).

3.7.1 Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA)

Na prova de IDGA utiliza-se antígeno solúvel grupo específico do BTV, sendo este capaz de detectar anticorpos induzidos por qualquer um dos 24 sorotipos do vírus, além disso, pode ocorrer reação cruzada com outros orbivírus que são estreitamente relacionados. Esta detecção se faz pela observação de uma linha de precipitação em gel de agarose (reação anticorpo-antígeno) do soro teste, que apresenta identidade com a linha de precipitação do soro controle positivo.

O kit para a realização da prova foi adquirido junto ao Panaftosa e as análises foram realizadas de acordo com o protocolo fornecido por este mesmo centro.

A prova de IDGA foi realizada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O ágar preparado a 1% em tampão borato, fundido em microondas e adicionando 16 mL em cada placa, as mesmas foram mantidas abertas em temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) em superfície nivelada até geleificar, após esse período as placas foram tampadas e transferidas para refrigerador 4°C invertidas onde permaneceram por no mínimo duas horas, podendo ser estocadas por até uma semana.

Foi utilizado o padrão de perfuração composto por seis orifícios na periferia e um central, com diâmetro externo de 4 mm e separados a 2 mm equidistantes entre si. Essas dimensões permitiram a utilização de até 7 moldes por placa.

Antes da realização da prova, o antígeno lote 9 (Anexo III - 6) e o soro controle positivo lote 1 foram diluídos em Tampão Glicina. Este antígeno já diluído foi adicionado no orifício central e o soro controle positivo nos três orifícios alternados (sentido horário), tomando como referência o orifício superior. Os soros testes foram adicionados nos três orifícios periféricos restantes.

O volume de soro e de antígeno utilizado foi de 25 µL, sempre trocando a ponteira para cada amostra. Após este procedimento as placas foram tampadas, mantidas em superfície nivelada e incubadas em temperatura ambiente durante 48 horas, quando foi realizada a leitura.

O padrão de reação varia de acordo com a concentração de anticorpos na amostra teste. A linha de precipitação do soro controle positivo foi o parâmetro para a leitura, se esta linha não apresentou nitidez, a prova não foi considerada válida.

Os resultados foram interpretados conforme demonstrado no quadro abaixo:

Quadro 2 – Interpretação dos resultados da prova de IDGA

Resultado	Característica
NEGATIVO	Linha de precipitação formada pelo soro controle e o antígeno se dirigem aos orifícios dos soros problemas vizinhos sem se curvar
FORTE POSITIVO	Quando a linha do soro controle se une à linha de precipitação formada pelo soro teste e o antígeno, formando uma linha contínua (identidade)
FRACO POSITIVO	A linha do soro controle se curva em direção ao orifício do soro problema não formando uma linha completa entre o antígeno e o soro teste. Amostras devem ser repetidas.
INESPECÍFICO	Formação de linhas que não possuem identidade com a linha do soro controle positivo. Estas linhas cruzam a linha de precipitação formada entre o soro controle positivo e o antígeno. A linha não específica não é contínua.

3.7.2 ELISA de competição da fase sólida (ELISA-CFS)

O ELISA de competição tem a característica de medir anticorpos específicos contra todos os sorotipos do BTV, sem detectar anticorpos de reação cruzada com outros orbivírus. Esta prova se baseia na interrupção ou não da reação entre o antígeno e o anticorpo monoclonal sorogrupo específico pela adição da amostra do soro teste. Existindo anticorpos contra o BTV no soro teste, este irá bloquear a reação do anticorpo monoclonal e como resultado tem-se a diminuição da cor obtida com a adição do substrato específico. O ELISA-CFS foi realizado utilizando uma diluição única do soro teste (1:10), conforme protocolo recomendado pelo fabricante (Panaftosa).

3.7.2.1 Sensibilização das placas

Primeiramente as placas (Nunc-Maxisorp) foram lavadas uma vez com água destilada e secadas em papel toalha. Após a completa secagem, em cada cavidade foram adicionados 50 µL de antígeno - BTV (Anexo III - 5), na diluição de uso (1:1500), em tampão salina fosfatada pH 7,4 - PBS (Anexo III - 1.1) e incubadas por 18 horas a 4°C.

Transcorrido este período, as placas foram retiradas do refrigerador e mantidas por 1 hora a temperatura ambiente (22 – 25°C) antes de se iniciar a outra etapa.

A etapa seguinte correspondeu na lavagem destas placas com salina fisiológica PBS (Anexo III - 2.1), secagem em papel toalha e na adição em cada cavidade de 50 µL de ovoalbumina grau V (Anexo III - 2.2) a 1% em PBS.

Estas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, após esse tempo, lavadas com solução fisiológica e secadas em papel toalha.

No fim deste processo as placas estavam sensibilizadas, podendo ser utilizadas imediatamente ou congeladas invertidas a -20°C, cobertas com adesivo plástico e armazenadas no máximo por seis meses.

3.7.2.2 Prova de ELISA-CFS “screening” para identificação de anticorpos contra BTV

As amostras testes foram diluídas em placas auxiliares adicionando-se 32 µL de tampão de diluição PBSTB (Anexo III – 1.2) nas linhas A - H até a coluna 8. Nas linhas A a F das colunas 10, 11 e 12 e na linha G colunas 9 a 12 (controle de antígeno) foram adicionados 40 µL de tampão de diluição PBSTB e na linha H colunas 9 a 12 foram acrescentado 80 µL de tampão de diluição PBSTB (controle branco). Foram adicionados 8 µL dos soros testes em duplicata (S1 a S32) nas cavidades (Esquema 1).

Nas mesmas placas auxiliares foram diluídos os soros controles (Anexo III – 3). Nas linhas A e B coluna 9 foram adicionados 50 µL do soro controle forte positivo (Anexo III – 3.1) diluído 1:25 em PBSTB, nas linhas C e D coluna 9 foram adicionados 50 µL do soro controle fraco positivo (Anexo III – 3.2) diluído 1:5 em PBSTB e nas linhas E e F coluna 9 foram adicionados 50 µL do soro controle negativo (Anexo III – 3.3). Foram feitas diluições seriadas na base 5, passando 10 µL para as cavidades seguintes e desprezando os 10 µL da última cavidade (Esquema 1).

Dando continuidade, em todas as cavidades das placas, exceto nas cavidades da linha H colunas 9 a 12 (branco) foram adicionados 40 µL do anticorpo monoclonal (Anexo III – 4) diluído 1:400 em PBSTB, a diluição do anticorpo monoclonal (AcM) foi feita à metade da diluição de uso, para no final se obter a diluição indicada (1:800).

Quadro 3 - Configuração da placa da prova de “screening”

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S 1 1:10	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	C++ 1:50	1:250	1:1250	1:6250
B	S 1 1:10	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	C++ 1:50	1:250	1:1250	1:6250
C	S 9	S 10	S 11	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	C+ 1:10	1:50	1:250	1:1250
D	S 9	S 10	S 11	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	C+ 1:10	1:50	1:250	1:1250
E	S 17	S 18	S 19	S 20	S 21	S 22	S 23	S 24	C- 1:2	1:10	1:50	1:250
F	S 17	S 18	S 19	S 20	S 21	S 22	S 23	S 24	C- 1:2	1:10	1:50	1:250
G	S 25	S 26	S 27	S 28	S 29	S 30	S 31	S 32	C _{Ag}	C _{Ag}	C _{Ag}	C _{Ag}
H	S 25	S 26	S 27	S 28	S 29	S 30	S 31	S 32	Bco	Bco	Bco	Bco

* 32 soros testes e Controles (C++=forte positivo, C=fraco positivo+ e C -=negativo) em duplicata

Com isso, a diluição final dos soros testes foi 1:10 e dos soros controles: (C++) 1:50, 1:250, 1:1250 e 1:16250, (C+) 1:10, 1:50, 1:250 e 1:1250 e (C-) 1:2, 1:10, 1:50 e 1:250.

Após a homogeneização das placas auxiliares foram transferidos 50 µL da mistura (soro teste x AcM) nas placas sensibilizadas. Estas então foram incubadas sob agitação em câmara úmida a 37°C por uma hora.

Após esse período, o conteúdo foi cuidadosamente descartado e as placas lavadas três vezes com salina fisiológica com 0.05% de tween 20. As placas foram secadas e se adicionou em todas as cavidades 50 µL de anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase 1:500. As placas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por uma hora com agitação, descartou-se novamente o conteúdo e as placas foram lavadas quatro vezes com salina fisiológica 0,05%.

Finalizando a prova, foi acrescentado em toda a placa 50 µL de diluição de OPD (orto-fenil-diamina) contendo H₂O₂, substrato para peroxidase (Anexo III - 1.3) e esta incubada em temperatura ambiente e no escuro por 15 minutos. A reação foi bloqueada adicionando-se em todas as cavidades 50 µL de ácido sulfúrico 3N.

As placas foram lidas na leitora de ELISA (Modelo Thermo Labsystem Multiskan Ascent) com filtro de 492 nm para obtenção dos valores de densidade óptica (DO).

3.7.2.3 Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados foi realizado um cálculo onde foi subtraído o valor da DO média do controle branco em todas as leituras. Com isso foi calculada a média dos valores de DO de cada amostra teste e do controle de antígenos.

As amostras negativas foram aquelas que apresentaram médias de DO superiores a 50% do valor médio da DO do controle de antígeno. As amostras positivas foram aquelas que apresentaram médias de DO inferiores a 50% do valor médio da DO do controle de antígeno.

3.7.2.4 Limites Superiores e Inferiores

Os soros controles de bovinos para BTV, indicados pelo Panaftosa para as provas de ELISA-CFS, foram estudados e analisados biologicamente. Os resultados foram expressos em logaritmo indicando os limites superiores e inferiores de validação da placa em cada teste. Os títulos indicados se referem exclusivamente a estes lotes que estão em uso.

- Controle Forte Positivo (C++): Lote 02

Limite Inferior	Limite Superior
2,60	3,00

- Controle Fraco Positivo (C+): Lote 01

Limite Inferior	Limite Superior
1,30	1,70

- Controle Negativo (C-): Lote 02

Limite Superior
..... < 1,0

4. Resultados e Discussão

4.1 Pesquisa de Anticorpo dos ovinos

Das amostras de soro dos ovinos jovens (três e sete meses), analisadas por IDGA, 13,75% (72/538) foram reagentes para anticorpos contra BTV (Tabela 4). As mesmas amostras, quando testadas pela técnica de ELISA-CFS, 19,33% (104/538) foram reagentes (Tabela 5) (Figura 1).

Na tabela 6, é apresentada a comparação entre as duas provas sorológicas. Dentre as 538 amostras analisadas, 52 (9,67%) ovinos foram reagentes e 415 (77,14%) foram não reagentes tanto na técnica de IDGA como no ELISA-CFS. Ainda 19 (3,53%) animais foram reagentes apenas na prova de IDGA e 52 (9,67%) animais reagentes somente no teste de ELISA-CFS.

Mesmo com as desvantagens da falta de especificidade e subjetividade da IDGA para diagnóstico da LA, desde o ano de 1982 este teste tem sido recomendado pela OIE para controlar o movimento internacional de ruminantes. Atualmente, para diagnóstico confirmatório, a OIE recomenda que os soros positivos por IDGA devam ser retestados utilizando um teste específico para LA, sendo a técnica preferida ELISA de competição fase sólida. Apesar da menor especificidade do IDGA (detecta outros orbivírus), as análises do presente trabalho revelaram menor número de animais reagentes. Este fato pode ser explicado pela menor sensibilidade diagnóstica do teste e possível ausência de outros orbivírus.

A correlação entre as técnicas de ELISA-CFS e IDGA foi determinada pelo coeficiente kappa, que apresentou um valor entre 0,41 e 0,60 ($k=0,519$), assumindo dessa forma uma correlação moderada (THRUSFIELD, 2004). Esses resultados trazem preocupação quando animais jovens são testados, pois provavelmente ainda não atingiram o pico de anticorpos e, portanto, não são detectados pelo teste de IDGA. Essa hipótese é reforçada pelos resultados de Nogueira, 2008 que analisou os ovinos adultos dos mesmos rebanhos e obteve alta concordância.

Tabela 4 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes, pela técnica de IDGA, contra o BTV, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

Propriedade	Nº. Amostras Analisadas	Resultado IDGA		% de Reagentes
		Reagente	Não Reagente	
A	55	3	52	5,45
B	16	4	12	25,00
C	60	5	55	8,33
D	59	11	48	18,64
E	71	6	65	8,45
F	36	6	30	16,67
G	55	6	49	10,91
H	6	0	6	0,00
I	26	3	23	11,54
J	49	17	32	34,69
L	11	1	10	9,09
M	7	0	7	0,00
N	87	10	77	11,49
Total	538	72	466	13,38

Tabela 5 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes, pela técnica de ELISA-CFS, contra o BTV, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

Propriedade	Nº. Amostras Analisadas	Resultado ELISA-CFS		% de Reagentes
		Reagente	Não Reagente	
A	55	7	48	12,73
B	16	4	12	25,00
C	60	12	48	20,00
D	59	16	43	27,12
E	71	4	67	5,63
F	36	8	28	22,22
G	55	9	46	16,36
H	6	0	6	0,00
I	26	7	19	26,92
J	49	22	27	44,90
L	11	3	8	27,27
M	7	0	7	0,00
N	87	12	75	13,79
Total	538	104	434	19,33

Tabela 6 – Comparação dos resultados obtidos entre a técnica de IDGA e ELISA-CFS, em 538 soros de ovinos, testados contra o BTV, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

		IDGA		Total
		Reagente	Não Reagente	
ELISA-CFS	Reagente	52	52	104
	Não Reagente	19	415	434
Total		71	467	538

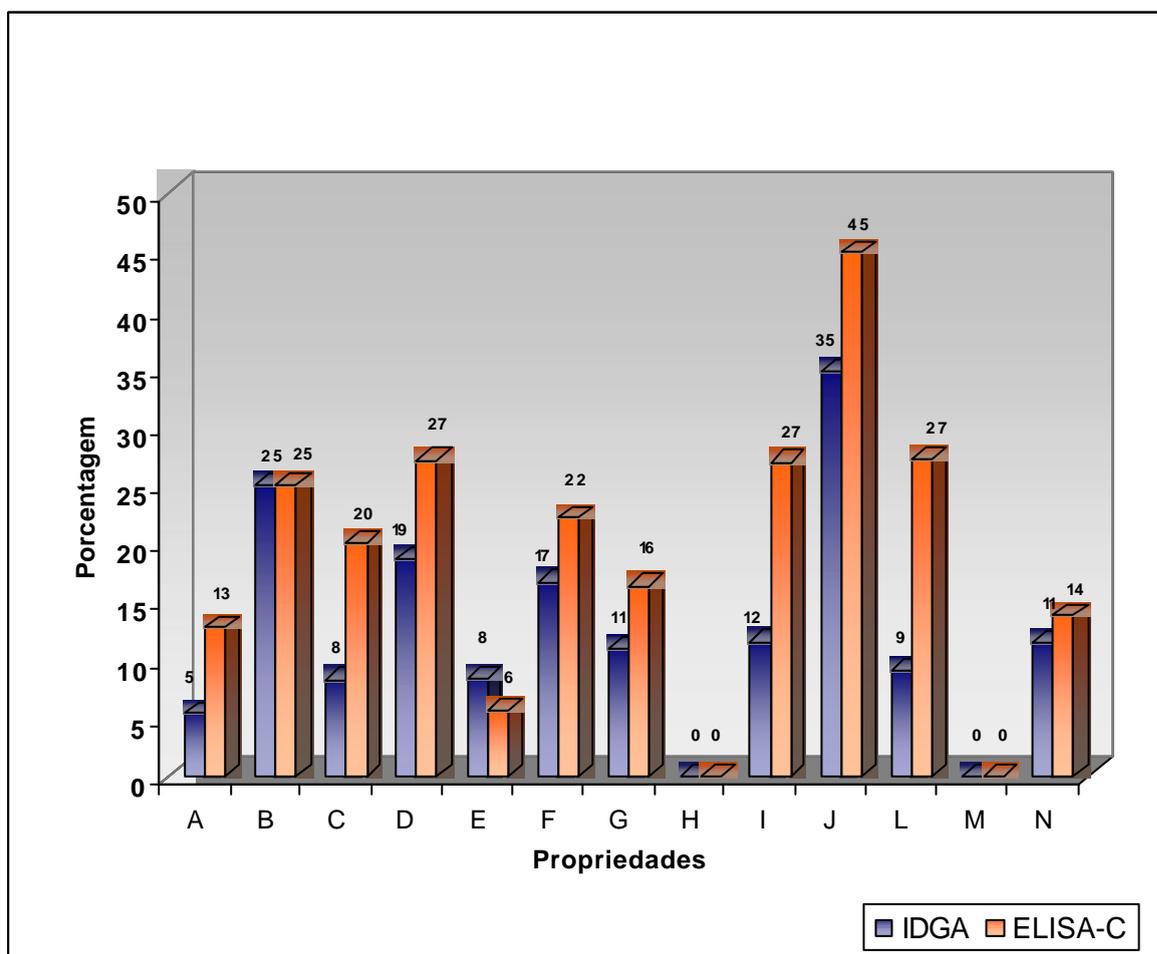


Figura 1 – Distribuição dos ovinos reagentes para o BTV, tanto na prova de IDGA quanto na de ELISA-C, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

A menor percentagem de ovinos jovens portadores de anticorpos era esperada, em relação aos animais adultos das mesmas propriedades que foi acima de 50%, pois nesta faixa etária os animais estão mais sensíveis, tendo em vista a queda dos anticorpos colostrais, portanto tornam-se mais expostos ao risco, aumentando a possibilidade de infecção e soroconversão. Vale lembrar que a época de colheita dos soros da maioria das propriedades ocorreu no período de chuvas (Tabela 9), quando a temperatura e a umidade estavam elevadas, fatores que favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores (*Culicoides spp*), facilitando a disseminação da doença (LOBATO, 1996).

O número de animais reagentes na prova de ELISA-CFS foi superior ao da prova de IDGA. Esta diferença nos resultados obtidos neste e em outros trabalhos (AFSHAR et al. 1989, REDDINGTON et al. 1991, VELIC et al. 2004, SHRINGI; SHRINGI 2005) pode ser explicada pelo fato do ELISA-CFS ser sabidamente mais sensível que a IDGA. Destacamos que houve 19 ovinos reagentes ao IDGA e não reagentes ao ELISA-CFS, fato que pode ser explicado pela falta de especificidade do IDGA, tendo em vista que essa prova detecta outros orbivírus. Por esse motivo a OIE recomenda com prova confirmatória de LA o ELISA teste que detecta apenas sorotipos desta doença.

4.2. Pesquisa do BTV em sangue ovino pela reação de nested RT-PCR

As amostras de sangue testadas foram provenientes de ovinos com idade entre 3 e 7 meses e de ambos os sexos, pertencentes a 13 propriedades localizadas em cidades da região de Araçatuba e Sorocaba.

Verificou-se que a sensibilidade da nested RT-PCR foi até a diluição 10^{-4} (título viral - $10^{4,7}$ TCID₅₀/mL), após a determinação da sensibilidade, o ensaio foi aplicado às amostras clínicas.

Das 538 amostras de sangue analisadas em 27 animais foi detectado produto de amplificação de 273 pb. Foram consideradas positivas ao BTV apenas as amostras que apresentaram repetibilidade em três testes (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos positivos, pela técnica de nested RT-PCR, para pesquisa do BTV, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

Propriedade	Nº. Amostras Analisadas	Resultado nested RT-PCR		% de Positivos
		Positivos	Negativos	
A	55	0	55	0,00
B	16	0	16	0,00
C	58	0	58	0,00
D	59	4	55	6,78
E	71	2	69	2,82
F	38	5	33	13,16
G	55	3	52	5,45
H	6	0	6	0,00
I	26	1	25	3,85
J	49	8	41	16,32
L	11	0	11	0,00
M	7	0	7	0,00
N	87	4	83	4,60
Total	538	27	513	5,01

Confrontando o resultado das 27 amostras positivas pela nested RT-PCR com a presença de anticorpos contra o BTV no soro, por provas de IDGA e ELISA-CFS, dez foram reagentes para ambas as técnicas, três foram reagentes na prova de ELISA-CFS e não reagentes na prova de IDGA, quatorze não reagiram em nenhuma das técnicas. A Tabela 8 mostra com mais detalhes essa distribuição.

Tabela 8– Distribuição do número de ovinos positivos, pela técnica de nested RT-PCR e seus resultados para pesquisa de anticorpos contra o BTV pelas técnicas de IDGA e ELISA-CFS, de acordo com a propriedade analisada, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

Propriedade	N ^o de Amostras Positivas pela nested RT-PCR	Identificação das amostras	Resultado da Pesquisa de Anticorpo	
			IDGA	ELISA-CFS
D	4	F 02	NR	R
		M 31	R	R
		M 35	R	R
		M 46	R	R
E	2	M 11	NR	NR
		F 23	NR	NR
F	5	04 F	R	R
		06 F	NR	NR
		BCO 107	NR	NR
		24 F	NR	NR
		BCO 18	R	R
G	3	07 F	R	R
		02 Su	NR	NR
		04 Su	NR	R
I	1	27	NR	NR
J	8	02 MO	R	R
		48	NR	NR
		83	R	R
		86	NR	NR
		154	R	R
		1046	NR	R
		1042	NR	NR
		4320	NR	NR
N	4	T 3	R	R
		T 7	NR	NR
		T 11	NR	NR
		T 92	NR	NR

R = Reagente, NR = Não Reagente

A nested RT-PCR revelou 5,01% (27/538) ovinos jovens positivos ao BTV. Em sete propriedades (D, E, F, G, I, J, N) foram detectados animais positivos com variação entre 2,82% (2/71) e 16,32% (8/49) e em seis das propriedades nenhum animal foi positivo pela nested RT-PCR.

A alta frequência encontrada pode ser devida ao fato que apenas animais com idade entre 3 a 7 meses foram amostrados, sendo esses mais suscetíveis, tendo em vista a queda dos anticorpos colostrais, e conseqüentemente expostos ao risco de infecção e, portanto, com maior probabilidade de apresentar viremia, fato também comprovado pela alta taxa de animais acima de um ano de idade portadores de anticorpos. Na literatura compulsada, não foi possível encontrar referências acerca de estudos semelhantes ao aqui apresentado.

Tanto na região de Araçatuba quanto na de Sorocaba encontrou-se cerca de 50% dos rebanhos infectados. Analisando as propriedades que apresentaram animais positivos pela nested RT-PCR, verificou-se que não houve diferença significativa entre as regiões onde estas se encontravam, ou seja, 3 propriedades (D, E e F) pertenciam à região de Araçatuba e 4 propriedades à região de Sorocaba (G, I, J, N).

As propriedades F-13,16% (5/38) e J-16,32% (8/49) se destacaram por apresentarem maior porcentagem de animais positivos do que as demais. Isso pode ser explicado por apresentarem fatores de risco em comum, como a criação de bovinos junto à de ovinos e, além disso, próximo ao local de criação dos ovinos existia uma grande área de represamento de água. Sabe-se que os bovinos são os mais importantes reservatórios do vírus, por apresentarem uma viremia prolongada, que pode chegar a 100 dias (GIBBS; GREINER, 1994) e a proximidade dos animais às aguadas favorece o contato com os insetos vetor.

Nas propriedades investigadas, apesar da alta frequência de animais virêmicos, nenhum ovino apresentou sinal clínico, contrariando dados da literatura que relatam os ovinos como a espécie que desenvolve doença severa, caracterizada por lesões inflamatórias em tecidos vascularizados como mucosas e bandas coronárias (BREARD et al., 2004; GIBBS; GREINER, 1994; LOBATO, 1999; MELLOR, 1996; MACLACHLAN, 1994). Esse fato indica a característica da infecção em regiões endêmicas, em que o vírus se dissemina de forma silenciosa, à semelhança do que é descrito nos bovinos. (LOBATO, 1999).

É importante ressaltar que as amostras foram estrategicamente colhidas no período quente e chuvoso nas regiões estudadas, exceto em três propriedades de Araçatuba, onde a colheita foi realizada na época de seca. A Tabela 9 mostra o mês/ano de colheita, temperatura média e a precipitação média das propriedades em suas respectivas cidades.

Tabela 9– Temperatura média, precipitação média e mês/ano da colheita das amostras de sangue ovino nas treze propriedades selecionadas e suas respectivas cidades, no período de 2007-08, São Paulo, SP.

Propriedade	Nº de Amostras	Mês/Ano da colheita	Cidade	Temperatura Média (°C)	Precipitação Média (mm)
A	55	Agosto/2007	Araçatuba	22,7	0
B	16	Agosto/2007	Araçatuba	22,7	0
C	60	Agosto/2007	Araçatuba	22,7	0
D	59	Fevereiro/2008	Araçatuba	26,3	122
E	71	Fevereiro/2008	Araçatuba	26,3	122
F	38	Fevereiro/2008	Araçatuba	26,3	122
G	55	Março/2008	Sorocaba	23,9	93,2
H	6	Março/2008	Sorocaba	23,9	93,2
I	26	Março/2008	Sorocaba	23,9	93,2
J	49	Abril/2008	Nova Odessa	22,2	143,3
L	11	Mai/2008	Botucatu	19,4	64,6
M	7	Março/2008	Sorocaba	23,9	93,2
N	87	Abril/2008	Itapetininga	21,3	108,7

Fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO)

Não coincidentemente nas propriedades A, B e C, onde a colheita de sangue foi realizada no mês de agosto de 2007, período que apresentou média precipitação igual à zero, nenhuma das 129 amostras analisadas foram positivas na nested RT-PCR. Provavelmente, a não detecção do BTV nessas amostras é explicada pela ausência de umidade neste período, uns dos principais fatores de risco da LA. Entretanto, as sete propriedades onde o vírus foi detectado apresentaram temperatura média variando de 21,3 a 26,3°C e média de precipitação 93,2 a 143,3 mm, fatores estes que favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores (*Culicoides spp*), facilitando a endemicidade da doença (LOBATO, 1996).

Com relação à sorologia dos animais positivos pela nested RT-PCR, verificou-se que cerca de 37,03% (10/27) dos animais foram reagentes ao BTV pelas técnicas de IDGA e ELISA-CFS e 51,85% (14/27) não foram reagentes em nenhuma das provas. Estes resultados indicam que os ovinos podem apresentar vírus e anticorpos simultaneamente por algum período, fato que pode ser explicado pela interação vírus-eritrócito que protege o vírus de sua neutralização pelos anticorpos. Esses dados reforçam a hipótese de outros autores em que o vírus pode persistir por 14-54 dias em ovinos (GHALIB et al., 1984/85;

KOUMNATI et al., 1999). Os ovinos soronegativos provavelmente apresentavam infecção recente e ainda não haviam soroconvertido. Três amostras foram reagentes na prova de ELISA-CFS e não reagentes na prova de IDGA, fato este explicado pela maior sensibilidade da prova.

As amostras de BTV obtidas neste estudo permitirão o planejamento de outros projetos com a finalidade de isolamento do vírus em ovo embrionado de galinha (OEG) e formação de banco viral, para posteriores estudos de caracterização. A carência de dados sobre os sorotipos circulantes e sua distribuição nas diferentes regiões do Brasil impossibilita ações diretas sobre o foco dos problemas que, conseqüentemente, impedem medidas rápidas para restabelecimento do controle.

4.3 Pesquisa de Anticorpo em touros residentes em Central de IA

Selecionou-se para o experimento as Centrais endemicamente infectadas para LA. A endemicidade foi comprovada pela pesquisa de anticorpos contra o BTV no soro dos touros das Centrais, cuja frequência foi 74,16% (244/329). Na tabela 10 estão apresentados os resultados das análises por IDGA dos últimos monitoramentos para LA da Central denominada "C", que forneceu a maior parte do sêmen (representando cerca de 65% das amostras de sêmen), realizados nos meses de março e setembro dos anos de 2006, 2007 e 2008. Esse detalhamento é importante para avaliar a dinâmica da LA na Central.

Tabela 10- Resultados das análises séricas de touros, colhidas em diferentes períodos, na Central de Inseminação Artificial denominada "C", para detecção de anticorpos contra o BTV utilizando a técnica de IDGA, 2006-08, São Paulo, SP.

Mês/Ano Colheita	% de Reagentes para LA
	(Reagentes/Total touros examinados)
Março de 2006	67,2 (131/195)
Setembro de 2006	85,6 (89/104)
Março de 2007	99,0 (95/96)
Setembro de 2007	83,2 (84/101)
Março de 2008	88,7 (86/97)
Setembro de 2008	85,4 (100/117)

Os resultados encontrados nos exames sorológicos dos touros mostraram que a maioria dos animais pesquisados apresentou anticorpos contra o BTV e a alta frequência se manteve sempre maior que 67%.

O elevado número de animais reagentes para se mostra condizente com outros relatos de rebanhos bovinos nacionais (CUNHA et al. 1987, CASTRO et al. 1992, MELO et

al. 1999), que revelam prevalência alta quando criados em locais onde estão presentes os comprovados fatores de risco para infecção pelo BTV touros em idade variando de 2 a 15 anos, viremia prolongada em bovinos, localização das Centrais na região Sudeste.

Outros fatores que justificam a alta porcentagem de animais com sorologia positiva para LA é a imunidade humoral duradoura, que segundo Pearson; Jochim, 1979, pode chegar a três anos, bem como o fato de tratar-se de animais que vivem grande parte do tempo estabulados ou em criações intensivas. Segundo Cunha et al. (1988) e Ward (1996), são estes os animais mais susceptíveis aos vetores, talvez pela alta concentração dos animais ou pelas características das instalações, tais como umidade elevada, presença de água parada e material orgânico, que favorecem o aparecimento e a multiplicação dos mosquitos vetores.

Destacando que nem sempre os mesmos animais foram analisados nos monitoramentos semestrais, pois a população de animais nas Centrais é variável, novos touros são admitidos e os residentes podem ser retirados na dependência de vários fatores, como estado sanitário, desempenho reprodutivo ou ainda a finalização do seu contrato de permanência.

4.4 Pesquisa do BTV em sêmen bovino pela reação de nested RT-PCR

Uma vez definidas as metodologias de detecção viral, bem como o estabelecimento da sensibilidade da prova, o ensaio foi aplicado às amostras clínicas. Verificou-se que a sensibilidade da nested RT-PCR foi na diluição 10^{-4} (título viral - $10^{4.7}$ TCID₅₀/mL),

Foram testadas 2268 partidas de sêmen industrializado de 404 touros, provenientes de sete Centrais de Inseminação Artificial (denominadas de A a G), pela prova de nested RT-PCR. Destas, em apenas 01 partida de sêmen foi detectado o BTV, 0,044% (1/2269) (Tabela 11), como observado na figura 2, no qual foi considerada positiva a amostra com produto de amplificação de 517 pb. Esta amostra positiva foi retestada por mais três vezes, e os resultados foram idênticos ao obtido na primeira análise, revelando repetibilidade do teste.

O touro positivo pertencia a Central A, raça Gir Leiteiro, nascido em 23/01/2005. Após 30 dias, novas amostras de sêmen e sangue foram coletadas. Desta vez também colheu-se soro para pesquisa de anticorpos, onde foram detectados anticorpos contra BTV, mas as amostras de sêmen e sangue foram negativas para pesquisa do vírus pela técnica de nested RT-PCR. Estes resultados indicam que a viremia foi menor que 30 dias. Não foi possível observar a soroconversão, tendo em vista que não foi colhido soro juntamente com a amostra de sêmen que foi positiva. Uma posterior etapa será a inoculação dessa amostra positiva em OEG, para isolamento viral.

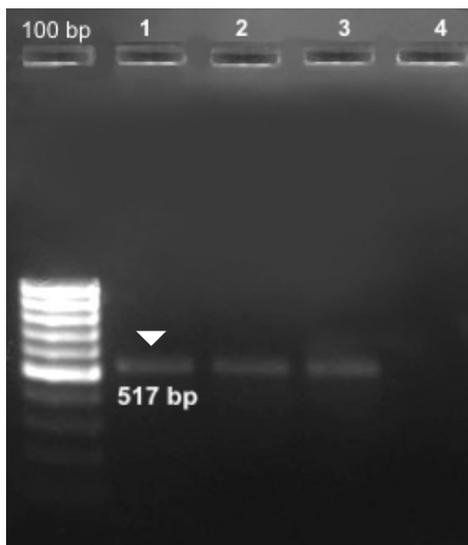


Figura 2 - Detecção do BTV em amostra de sêmen bovino utilizando nested RT-PCR. 1 e 2- Amostra sêmen positiva para BTV (duplicata), 3- Controle positivo BTV-4, 4- Controle negativo.

Tabela 11 - Distribuição do número de amostras de sêmen bovino testadas para pesquisa do BTV pela técnica de nested RT-PCR, de acordo com as Centrais de Inseminação Artificial, no período de 2007-08, São Paulo, SP

Central	Nº. Touros analisados	Nº. Partidas Analisadas	Resultado nested RT-PCR	
			Positivo	Negativo
A	139	365	1	364
B	1	1	0	1
C	160	1467	0	1467
D	51	250	0	250
E	20	48	0	48
F	29	94	0	94
G	4	44	0	44
Total	404	2269	1	2268

A alta frequência de touros portadores de anticorpos contra língua 74,16% (244/329), pode explicar detecção de apenas uma partida de sêmen bovino positiva em relação ao total de partidas analisadas. Isso indica que bovinos com idade superior a dois anos já se infectaram apresentando risco menor de eliminação do vírus pelo sêmen, pois já soroconverteram ao sorotipo circulante na região. A ocorrência rara de vírus no sêmen de bovinos confirma que a eliminação é restrita ao período virêmico, coincidindo, normalmente com o pico da viremia e ainda que o sêmen deve conter sangue (BOWEN et al., 1985; AFSHAR; EAGLESOME, 1990; WRATHALL et al., 2006; KIRKLAND et al. 2004).

É importante dizer que até o presente momento, no Brasil não há relatos sobre detecção do BTV em sêmen de bovinos naturalmente infectados.

5. Conclusões

5.1 Foi detectada alta frequência de ovinos virêmicos com idade variando de 03 a 07 meses (média 5%)

5.2 Apesar da alta frequência de touros soropositivos, o BTV foi detectado em apenas uma amostra de sêmen pela técnica de nested RT-PCR padronizada

5.3 A ocorrência de ovinos jovens (3 a 7 meses) reagentes para LA foi menor que em ovinos adultos (acima de 1 ano de idade)

5.4 Embora a IDGA detecte outros orbivírus além do BTV, o ELISA-CFS revelou maior número de animais reagentes

5.5 As técnicas de IDGA e ELISA-CFS apresentaram concordância moderada quando testados animais jovens

5.6 A temperatura e umidade elevadas favoreceram a detecção de animais virêmicos

5.7 Foi possível padronizar uma RT-PCR capaz de detectar o BTV até a diluição 10^{-4}

6. Referências Bibliográficas

AFSHAR, A.; THOMAS, F.C.; WRIGHT, P.F.; SHAPIRO, J.L.; ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting blue-tongue virus antibodies in cattle and sheep. **Vet. Rec.**, v. 124, 1989, p. 136-41.

AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Vet. Bull.**, v.60, n.2, 1990, p.93-109.

AGÜERO, M, ARIAS, M., ROMERO, L.J., ZAMORA, M.J., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. **Vet Microbiol.**, v. 86, 2002, p. 337-41.

ALVES, F.A.L., ALVES, C.J., AZEVEDO, S.S., SILVA, W,W,, SILVA, M.L.C.R., LOBATO, Z.I.P., CLEMENTINO, I.J. Soroprevalência e fatores de risco para língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, 2008.

ARADAIB I.E., SCHORE C.E., CULLOR J.S. & OSBURN B.I. A nested PCR for detection of North American isolates of bluetongue virus based on NS1 genome sequence analysis of BTV-17. **Vet. Microbiol.**, v. 59, 1998, p. 99-108.

BABU, N.G.R. Isolation and preliminary characterization of bluetongue virus from sheep. **Indian Vet. J.**, v. 69, n. 12, 1992, p. 1071-1074

BATTEN, C.A; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BIN-TARIF, A.; KGOSANA, L.; SWAIN, A.J.; CORTEYN, M.; DARPEL, K.; MELLOR, P.S.; ELLIOTT, H.G.; OURA, C.A.L. Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. **Vet. Microbiol.**, v. 129, 2008, p. 80–88.

BARRATT-BOYES S.M., MACLACHLAN N.J. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves, **Vet. Microbiol.** v. 40, 1994, p. 361–371.

BARRATT-BOYES S. M., ROSSITTO P. V., TAYLOR B. C., ELLIS J. A. AND MACLACHLAN N. J. Response to the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 45, n. 1, 1995, p. 73-84.

BILLINIS C., KOUMBATI M., SPYROU V., NOMIKOU K., MANGANA O., PANAGIOTIDIS C.A.; PAPADOPOULOS O. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription – PCR: a comparison with conventional methods. **J. Virol. Methods**, v. 98, 2001, p. 77-89.

BONNEAU K.R., DEMAULA C.D., MULLENS B.A., MACLACHLAN N.J., Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep, **Vet. Microbiol.**, v. 88, 2002, p.115–125.

BORKENT, A.; WIRTH, W.W. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, 1997, p. 233-257

BOWEN, R.A.; HOWARD, T.H.; PICKETT, B.W. Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 178, 1985, p. 91-96.

BREARD, E.; HAMBLIN, C.; HAMMOUMI, S.; SAILLEAU, C.; DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. **Res. Vet. Sci.**, v. 77, 2004, p.1-8.

BREWER A.W., MACLACHLAN N.J., The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. **Arch. Virol.**, v. 136, 1994, p. 287–298.

BRODIE S.J., WILSON W.C., O'HEARN P.M., MUTHUI D., DIEM K., PEARSON L.D. The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription in situ PCR. **J. Virol.**, v. 72, 1998, p. 5599–5609.

CANNON, R. M. AND ROE, R. T. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. **Australian Bureau of Animal Health**, Canberra, 1982, p. 14-17.

CARVALHO, L.F.R.; DE MELO, C.B.; V.O. Procedimentos para exportação e importação de material genético pelo Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, 2007, p. 415-422.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; ABREU, J.J.; LAGE, A.P.; FERRAZ, I.B.; LOBATO, Z.I.; BALSAMAO, S.L. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 24, n. 3, 1992, p.173-176.

CIAGRO – Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/>. Acesso em: janeiro 2009.

CLAVIJO, A.; HECKERT, R.A.; DULAC, G.C.; AFSHAR, A. Isolation and Detection of Bluetongue Virus. **J. Virol. Meth.**, v. 87, 2000, p. 13-23.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J.W. Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America. **Vet. Rec.**, v. 7, 2002, p. 301-302.

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 da região Sul do País. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 9, 1987, p. 121-124.

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. **Arq. Flum. Méd. Vet.**, v. 3, 1988, p. 53-56.

DEMAULA C. D., HEIDNER H. W., ROSSITTO P. V., PIERCE C. M. AND MACLACHLAN N. J. Neutralization determinants of United States bluetongue virus serotype 10. **Virology**, v. 195, 1993, p. 292-296.

DUNGU B., GERDES T. & SMIT T. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. **Vet. Ital.**, v. 40, 2004, p. 616–622.

ERASMUS B.J. The control of bluetongue in an enzootic situation. **Aust. Vet. J.**, v. 51, 1975, p. 209–210.

GHALIB, H.W.; CHERRINGTON, J.M.; OSBURN, B.I. Virological, clinical and serological responses of sheep infected with tissue culture adapted bluetongue virus serotype 10, 11, 13 and 17. **Vet. Microbiol.**, v. 10, p. 179-88, 1984/85.

GIBBS, E.P., GREINER, E.C. The epidemiology of bluetongue. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, p. 207–220, 1994.

GOLDSMITH L., BARAZILAI E. An improved method for the isolation and identification of bluetongue virus by intravenous inoculation of embryonating chicken eggs. **J. Comp. Pathol.**, v. 78, 1968, p. 477-487.

GREINER, E.C.; BARBER, T.L.; PEARSON, J.E.; KRAMER, W.L. & GIBBS, E.P.J. Orbiviruses from Culicoides in Florida p.195-200. **Bluetongue and Related Orbiviruses** (T.L. Barber & M.M. Jochim Eds.) A.R. Liss, New York, 1985.

GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Can. J. Comp. Med.**, v. 46, 1982, p. 160-164.

HUISMANS H., VAN DER WALT N.T., CLOETE M., ERASMUS B.J. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. **Virology**, v. 157, 1987, p. 172–179.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS — IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=2&i=P>>. Acesso em: agosto 2008.

JOHNSON D.J., OSTLUND E.N., STALLKNECHT D.E., GOEKJIAN V.H., JENKINS-MOORE M., HARRIS S.C., First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States, **J. Vet. Diagn.**, v. 18, 2006, p. 398–401.

KATZ J., ALSTAD D., GUSTAFSON G., EVERMANN J. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep, **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, 1994, p. 139–142.

KIRKLAND, P.D., ZHANG, N., HAWKES, R.A., LI, Z., ZHANG, F., DAVIS, R.J., SANDERS, D.A., LI, H., ZHANG, K., BEN, J., HE, G.F., HORNITZKY, C.L., HUNT, N.T. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, 2002, p. 257–263.

KIRKLAND, P.D., MELVILLE, L.F., HUNT, N.T., WILLIAMS C.F., R.J. DAVIS. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adopted virus, **Vet. Ital.** 40, 2004, p. 497–501.

KONRAD, P.A; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de minas gerais e associações com problemas reprodutivos. **Rev. Fac. Zoo. Vet. Agro.**, Uruguaiana, v. 10, 2003, p. 42 - 51.

KOUMBATI, M.; MANGANA, O.; NOMIKOU, K.; MELLOR, P.S.; PAPADOPOULOS, O. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. **Vet. Microbiol.**, v. 64, 1999, p. 277-85.

KRAMER, W.L.; GREINER, E.C. & GIBBS, E.P.J. Seasonal variations in population size, fecundity and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. **J. Med. Entomol.**, v. 22, 1985, p. 163-169.

LAENDER, J.O. Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise da evidência clínica e sorológica e identificação de *Culicoides* sp. 2002, 92p. **Dissertação Mestrado – Univ. Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**, 2002.

LAGE, A.P.; CASTRO, R.S.; MELO, M.I.; AGUIAR, P.H.; BARRETO FILHO, J.B.; LEITE, R.C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais state, Brazil. **Rev. Elev. Méd. Vet. Pays Trop.**, v. 49, n. 3, 1996, p.195-197.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in south America overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Vet. Ital.**, v. 40, n. 3, 2004, p. 89-93.

LOBATO, Z. I. P. Vírus de língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccínia e resposta imune. **Tese de Doutorado - UFMG – Escola de Veterinária**, Belo Horizonte, 1996.

LOBATO, Z.I.P. Língua azul: a doença nos bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 4, 1999, p. 515-523.

LOBATO, Z.I.P.; BARCELOS, M.A.C.; LIMA, F.; RIBEIRO, E.B.T.; YORINORI, E.H., GOUVEIA, A.M.G. Língua azul em ovinos e caprinos na Região Mineira da SUDENE. **Congresso Brasileiro de Buiatria**, Campo Grande, MS., Abs., 2001, p. 165.

MARTIN, S. W., SHOUKRI M., THORNBURN M. A. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Prev. Vet. Med.**, v. 14, 1992, p. 33-43.

MASON, J.H., COLES, J.D.W., ALEXANDER, R.A. Cultivation of bluetongue virus in fertile eggs produced on vitamin deficient diet. **Nature**, v. 145, 1941, p. 1022–1023.

MCLACHLAN N. J., JAGELS G., ROSSITTO P. V., MOORE P. F. AND HEIDNER H. W. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. **Vet. Pathol.**, v. 27, 1990, p. 223-229.

MCLACHLAN, N.J. The Pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. **Comp. Immun. Microbiol. Dis.**, v. 17, 1994, p. 197-206.

MELLOR, P.S. Culicoides: vectors, climate change and disease risk. **Vet. Bull.**, v. 66, n. 4, 1996, p. 301-306.

MELLOR, P.S. The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 162, 1990, p. 143-161.

MELLOR, P.S. *Culicoides*: vectors, climate change and disease risk. **Vet. Bul.**, v. 66, n. 4, 1996, p. 301-306.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 1, 1999, p.19-20.

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

MO, C.L., THOMPSON, L.H., HOMAN, E.J., OVIEDO, M.T., GREINER, E.C., GONZALEZ, J., SAENZ, M.R. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in central America and the caribbean. **Am. J. Vet. Res.**, v. 55, 1994, p. 211–215.

MURRAY, P.K.; EATON, B.T. Vaccines for bluetongue. **Aust. Vet. J.**, v. 73, n. 6., 2006, p.207-210.

NOGUEIRA, A.H.C.; CARDOSO, T.C.; PITUCO, E.M., DE ESTEFANO, E., CHIEBAO, D.P., CURCI, V.C.L.M – Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Língua azul (BTV) em ovinos da região Noroeste do Estado de São Paulo. **XX RAIB - Reunião Anual do Instituto Biológico - O Biológico**, São Paulo, v. 69, 2008, p. 115.

NOORDHUIZEN, J P T M, FRANKENA K, VAN DER HOOF, C M, GRAAT, E. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. **Wageningen Pers. The Netherlands**, 1997, p. 50.

OIE – World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2008. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: janeiro de 2009.

PANDOLFI, J.R.C. Língua azul e Doença Hemorrágica dos Cervídeos: Investigação Sorológica em Ruminantes Domésticos e Silvestres. **Dissertação Mestrado – UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias**, Jaboticabal, 1999.

PARSONSON I.M. Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 162, 1990, p.119–141.

PEARSON, J. E., JOCHIM, M. M., Protocol for the immunodiffusion test for bluetongue. **Am. Assoc. Vet. Lab. Diag. Proc**, v. 22, 1979, p. 463-471.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

REDDINGTON, J. J.; REDDINGTON, G. M.; MACLACHLAN, N. J. Competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 3, 1991, p. 144-147.

RICHARDS R. G., MACLACHLAN N. J., HEIDNER H. W. AND FULLER F. J. Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10. **Vet. Microbiol.** v. 18, 1988, p. 233-242.

ROY, P. Bluetongue virus genetics and genome structure. **Virus Res.**, v. 13, 1989, p. 179–206.

ROY, P. Bluetongue virus proteins. **J. Gen. Virol.**, v. 73, 1992, p. 3051–3064.

SAVINI, G.; N. JAMES MACLACHLAN, N.J.; SANCHEZ-VIZCAINO, J.M.; ZIENTARA, S. Vaccines against bluetongue in Europe. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, 2008, p. 101–120.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P. P. C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BREARD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Vet. Res.**, 2008, p. 39-46.

SHRINGI S., SHRINGI B. N. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India. **J. Vet. Sci.**, v. 6, 2005, p. 77–79.

STAUD, N.P.; SILVA, R.O.P. Perspectiva da Produção de Ovinos no Estado de São Paulo. Análises e Indicadores do Agronegócio v. 3, n. 5, maio 2008. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/mercado/hp-30-2008.pdf>. Acesso em: agosto 2008.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, 2a ed., São Paulo, Roca, 2004, p. 340-42.

TOMORI, O., BABA, S., ADU, F., ADENIJI, J. An overview and perspective on orbivirus disease prevalence and occurrence of vectors in Africa. In: Walton, T.E., Osburn, B.I. (Ed.), **Bluetongue African Horse Sickness and related orbiviruses**, 1992, p. 23–33.

VELIC, L., VELIC, R., BAJROVIC, T., DUKIC, B.,D. Bluetongue in Bosnia: comparisons of competitive enzyme-linked immunosorbent assay and standard agar gel immunodiffusion tests. **Vet. Ital.**, v. 40, 2004, p. 562-563.

VERWOERD D., ERASMUS B.J. Bluetongue. Em: Coetzer JA, Tustin RC, editors. Infectious diseases of livestock, **Oxford University Press**, 2º ed., 2004, p. 1201–20.

WALTON, T. E. The diagnosis and control of bluetongue. **Bull. Off. Int. Epiz.** v. 92, 1980, p. 512-523.

WARD, M.P. Seasonality of infection of cattle with bluetongue viruses. **Prev. Vet. Med.**, v. 26, 1996, p. 133-141.

WARD, M.P. Climatic factors associated with the prevalence of bluetongue virus infection of cattle herds in Queensland, Australia. **Vet. Rec.**, v. 134, 1994, p. 407-410.

WARD, M.P.; THURMOND, M.C. Climatic factors associated with risks of seroconversion of cattle to bluetongue viruses in Queensland. **Prev. Vet. Med.**, v. 24, 1995, p.129-136.

WECHSLER SJ, HOLLAND LE. Susceptibilities of 14 cell lines to bluetongue virus infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, 1988, p. 2324-2327.

WHETTER L.E., MACLACHLAN N.J., GEBHARD D.H., HEIDNER H.W., MOORE P.F. Bluetongue virus infection of bovine monocytes, **J. Gen. Virol.**, v. 70, 1989, p.1663–1676.

WILSON D.C., MA H.C., VENTER E.H., VAN DJIK A.A., SEAL B.S., MECHAM J.O., Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7, **Virus Res.**, v. 67, 2000, p.141–151.

WITTMANN, E.J. AND BAYLIS, M. Climate change: effects on *Culicoides* transmitted viruses and implications for the UK. **Vet. J.**, v. 160, 2000, p. 107-117.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus infected semen. **Theriogenology**, v. 65, 2006, p. 247-274.

7. Anexos

7.1 Anexo I – Questionário das Propriedades

1. Identificação do Estabelecimento		Data da coleta: ___/___/___
a. Nome do proprietário ou responsável:		
b. Nome da propriedade:		Coordenadas:
Endereço completo:		
d. Município :		UF:
e. Telefones:		
f. E-mail:		
2. Dados de manejo do estabelecimento		
g. Espécie: ovina		
h. Raça:		
Finalidade:	<input type="checkbox"/> Abate <input type="checkbox"/> Reprodução <input type="checkbox"/> Cria/recria <input type="checkbox"/> Terminação	
Área destinada à criação em hectares (ha):		
Número de animais no rebanho: _____ machos _____ fêmeas		
Origem dos animais da propriedade: () Nacionais ____UF de origem () Importados ____ país de origem		
Manejo Reprodutivo		
Estação de parição ? () Não () Sim – Duração: _____ dias e Período do ano: _____		
Local de parição: () Campo () Piquete () Outros _____		
Tempo de permanência no piquete: Pré-parto _____ dias Pós-parto _____ dias		
Fatores de Risco para LA:		

7.2 Anexo II - Ficha clínica Individual

3. Identificação do animal afetado
Espécie: ovina
Raça:
Nº. registro:
Sexo: <input type="checkbox"/> macho <input type="checkbox"/> fêmea
Data do nascimento: __/__/__
4. Histórico da enfermidade
Data do início dos sintomas: __/__/__
Data da morte: __/__/__
Sintomatologia clínica:
Descrição dos sinais clínicos:
5. Rastreamento do animal afetado
Nascido na propriedade? (se não indicar a propriedade/município/UF)
Identificação individual, localização atual e relação de parentesco com os animais de alto risco existente na propriedade:
Identificação individual, localização atual e relação de parentesco com os animais de alto risco movimentados para outras propriedades:
Identificação individual, localização atual dos animais expostos existentes na propriedade:
Identificação individual, localização atual dos animais expostos movimentados para outras propriedades:

7.3 Anexo III – Reagentes para prova de ELISA-CFS e IDGA

Todas as formulações são equivalentes a uma placa de ELISA-CFS

1. Tampões para prova ELISA-CFS:

1.1 Tampão salina fosfatada pH 7,4

Fórmula:

NaCl.....	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O.....	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O destilada (qsp).....	1000 mL

Filtrar 0,20 µ e armazenar 4 °C por 6 meses.

1.2 Tampão PBSTB

PBS.....	20 mL
Tween 20 (0.05%).....	10 µL
Ovoalbumina grau II (1%)....	0,2 g

1.3 Tampão ácido diluente do OPD – pH 5,0

a) Ácido cítrico – 0,1 M

Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇).....	2,1 g
H ₂ O destilada (qsp).....	25,0 mL

b) Fosfato de sódio – 0,2 M

Na ₂ HPO ₄	2,84 g
H ₂ O destilada (qsp).....	100,0 mL

c) Peróxido de hidrogênio – 1:1150

H ₂ O ₂ (30%).....	100 µL
H ₂ O destilada (qsp).....	25,0 mL

Preparar imediatamente antes do uso:

- a).....6,5 mL
- b)7,0 mL
- c)11,5 mL
- OPD*0,01 g

* Orto-fenil-diamina

2. Solução de Lavagem prova ELISA-CFS

2.1 Salina Fisiológica pH 7,4

- NaCl.....8,5 g
- H₂O destilada (qsp).....1000 mL

2.2 Ovoalbumina grau V - 1%

- Ovoalbumina grau V....0,1 g
- PBS.....10 mL

3. Referência dos soros controles para prova de ELISA-CFS

3.1. Controle forte positivo: “pool” de soros bovinos reagentes nas provas de virusneutralização.

3.2. Controle fraco positivo: “pool” de soros bovinos de áreas livres misturados com soros bovinos reagentes nas provas de virusneutralização.

3.3. Controle negativo: “pool” de soros bovinos não reagentes nas provas de virusneutralização, com título menor que 1:10.

4. Anticorpo Monoclonal (AcM) 40FD8 para prova de ELISA-CFS

Fornecido pelo Setor de anticorpos monoclonais do Panaftosa. Anticorpo isótopo IgG2a, obtidos por fusão de células esplênicas de camundongos BALB/c, pré-imunizados com o vírus ativo, sorotipo 4, que é dirigido contra a proteína VP7. Alíquotas armazenadas em 0,20 a 1,8 ml a temperatura de -20°C

5. Antígeno Língua azul para prova de ELISA-CFS

Fornecido pelo Setor de anticorpos monoclonais do Panaftosa.

Vírus de Referência: vírus da língua azul, sorotipo 4, obtido por inoculação em células BHK de linhagem contínua, inativado com BEI. Alíquotas armazenadas a temperatura de – 80°C.

6. Antígeno Língua azul para prova de IDGA

Fornecido pelo Setor de anticorpos monoclonais do Panaftosa. Antígeno proveniente por suspensão do BTV, sorotipo 4, replicado em células BHK-21, clone 13, inativadas com 3mM de BEI a 26°C, durante 24 horas e concentrada 40 vezes com filtro Amicon, seguido de uma ultracentrifugação durante 2 horas a 200000g. Posteriormente a agregação de 0,02% de azida sódica. O Ag é então titulado, fracionado e conservado a 4°C.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)