

T686.089 69

C 837p

2000

JOSÉ RENATO DE REZENDE COSTA

**PRODUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE ANTÍGENO PARA LÍNGUA  
AZUL E PREVALÊNCIA NAS MESORREGIÕES SUDOESTE E  
SUDESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 1999.**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina  
Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Profa. Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte  
2000**

C837p  
2000

Costa, José Renato de Rezende, 1971-

Produção e padronização de antígeno para língua azul e prevalência nas mesorregiões sudoeste e sudeste do estado do Rio Grande do Sul, 1999 / José Renato de Rezende Costa. -Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2000.

53 p.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1 Bovino - Doenças- Vacina - Teses. 2. Ovino - Doenças - Teses. 3. Língua Azul (Veterinária) - Teses. 4. Imunodifusão. Teses. I.Título.

CDD - 636.089 692

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

21/02/01

152201-09

0305 - 58560

Dissertação defendida e aprovada em 31 de março de 2000, pela Comissão de examinadora constituída por:



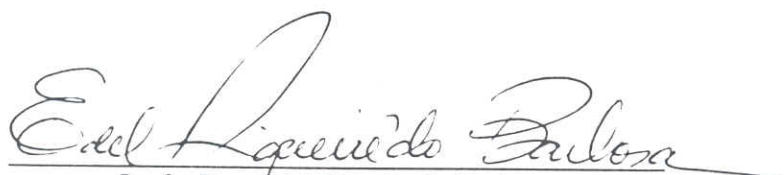
---

Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato  
Orientadora



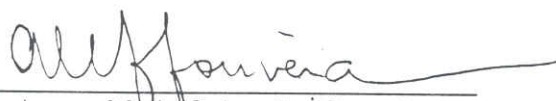
---

Dra. Vera Lúcia Viegas de Abreu



---

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa



---

Profa. Dra. Aurora Maria Guimarães Gouveia



---

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

*“Para Ele,*

*O que fazemos é tudo:  
Fé sem obras não é nada.*

*Para Ele,*

*Fazer é crer  
e crer é fazer.”*

**GANDHI**

## AGRADECIMENTOS

À DEUS que a tudo devemos e tudo dedicamos.

À minha MÃE *in memoriam* e ao meu PAI por tornarem possível esta conquista.

Aos meus irmãos, cunhados e familiares pelo incentivo e ajuda prestadas durante o desenvolvimento do trabalho.

À Larissa que me incentivou e teve paciência em muitos momentos da execução deste trabalho com amor e carinho.

Aos professores Rômulo, Edel, Andrey, Chico, José Ailton, João Paulo e Aurora pela confiança, experiência, auxílio, amizade e força despendidas durante toda a minha permanência na EV-UFMG.

Ao meu companheiro de viagem e amigo Géder pela demonstração de perseverança e força de vontade para vencer os obstáculos da vida, além da ajuda inestimável para concretização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do DMVP-UFMG, Ana Paula/Win, Cid, Josely, Giovana, Gláucia, Roberto, Cláudia, Cristiano, Aiesca/Beto, Ricardo, Cristina, Carol, Luciana, Simone, Rizaldo/Alice, Fábio/Patrícia, Marcos e demais colegas pelos momentos de felicidades, discussões, tristezas, insatisfações e sucessos realizados no período de nossa convivência além da indispensável ajuda prestada.

À Juliana, Doracy, Creuza e Fernanda pela amizade firmada e auxílio prestados indispensáveis para o sucesso deste trabalho.

À Nádia pela amizade, companheirismo e alegria transpassadas durante todo o tempo, além da ajuda fundamental nos processos de digitação da tese.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio para realização deste trabalho.

À Professora Zélia pela orientação, amizade, experiência e dedicação, que tornou possível a minha meta de conclusão do grau de MESTRE.

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. LITERATURA CONSULTADA</b> .....	16
2.1. IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR.....	16
2.2. OUTROS TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA LÍNGUA AZUL.....	17
2.3. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO PARA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR.....	17
2.4. PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TESTE DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR.....	17
2.5. DISTRIBUIÇÃO DA LÍNGUA AZUL NO MUNDO E NO BRASIL.....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1. AMOSTRA VIRAL E CÉLULAS.....	19
3.2. TITULAÇÃO VIRAL.....	19
3.3. PRODUÇÃO DO ANTÍGENO.....	20
3.3.1. PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL.....	20
3.3.2. PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO.....	20
3.3.3. ARMAZENAMENTO DO ANTÍGENO PRODUZIDO.....	20
3.4. DOSAGEM PROTÉICA DO ANTÍGENO PRODUZIDO.....	20
3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	20
3.6. COLORAÇÃO PELA PRATA.....	21
3.7. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE E ESTABILIDADE DO ANTÍGENO.....	21
3.8. ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM BOVINOS E OVINOS DO RIO GRANDE DO SUL.....	21
3.8.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA E DA POPULAÇÃO OVINA E BOVINA DO RIO GRANDE DO SUL.....	21
3.8.2. REGIÃO ESTUDADA.....	25
3.8.3. TAMANHO DA AMOSTRA.....	27
3.8.4. ESTRATIFICAÇÃO.....	27
3.9. COLETA DE SANGUE.....	28
3.10. QUESTIONÁRIO.....	28
3.11. PROVA SOROLÓGICA PARA DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL NO RIO GRANDE DO SUL.....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
4.1. COMPARAÇÃO ENTRE OS ANTÍGENOS CONCENTRADO E CONCENTRADO/ULTRACENTRIFUGADO.....	29
4.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	29
4.3. REATIVIDADE X ESTABILIDADE DO ANTÍGENO PRODUZIDO.....	29
4.4. CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES ESTUDADAS.....	33
4.5. PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL NAS MESORREGIÕES SUDOESTE E SUDESTE DO RIO GRANDE DO SUL EM OVINOS.....	39
4.6. PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL NAS MESORREGIÕES SUDOESTE E SUDESTE DO RIO GRANDE DO SUL EM BOVINOS.....	41

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
5.1.	ANTÍGENO PRODUZIDO.....	45
5.2.	REATIVIDADE X ESTABILIDADE DO ANTÍGENO PRODUZIDO.....	45
5.3.	PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DO RIO GRANDE DO SUL.....	46
5.4.	PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL.....	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>
	<b>ANEXO I</b> .....	<b>53</b>

---

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Anticorpos anti-VLA detectados em vários estados do Brasil, por IDGA.....	18
Tabela 2.	Distribuição das mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul, 1999.....	22
Tabela 3.	Distribuição dos rebanhos de ovinos e bovinos no Estado do Rio Grande do Sul por mesorregião, 1999.....	22
Tabela 4.	Municípios das mesorregiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul onde foram coletados soros de ovinos e bovinos com respectivas unidades amostrais, 1999.....	27
Tabela 5	Reatividade do antígeno padrão (Pa) bruto diluído duas e quatro vezes comparado ao antígeno produzido com e sem PMSF, armazenados a 4°C, no dia da produção frente ao soro controle positivo.....	31
Tabela 6	Reatividade do antígeno produzido bruto em diferentes temperaturas de conservação e em diferentes períodos, com e sem PMSF, comparado ao Ag padrão (Pa) armazenado a 4°C frente ao soro controle positivo.....	31
Tabela 7	Reatividade do antígeno produzido diluído duas vezes em diferentes temperaturas de conservação e em diferentes períodos, com e sem PMSF, comparado ao Ag padrão (Pa) armazenado a 4°C frente ao soro controle positivo.....	31
Tabela 8.	Resultados de Imunodifusão em Gel de Ágar para Língua Azul em ovinos do Rio Grande do Sul, 1999.....	39
Tabela 9.	Resultados de Imunodifusão em Gel de Ágar para Língua Azul em bovinos do Rio Grande do Sul, 1999.....	41

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.	Ecosistemas da Língua Azul .....	15
Figura 2	Titulação do antígeno.....	21
Figura 3.	Mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul, segundo IBGE (1996).....	23
Figura 4	Municípios do Estado do Rio Grande do Sul onde foram amostras e coletados soros de bovinos e ovinos, 1999.....	25
Figura 5.	Mapa de distribuição do antígeno (Centro). soro controle positivo (1 e 4) e amostras de campo (2, 3, 5 e 6) na lâmina.....	28
Figura 6.	Eletoforese em mimnigel de poliacrilamida corado pela prata.....	29
Figura 7.	Tipo de explorações para ovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	33
Figura 8.	Tipo de explorações para bovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	33
Figura 9.	Tipo de criações para bovinos encontradas nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	35
Figura 10.	Características raciais dos ovinos encontradas nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	35

Figura 11.	Características raciais dos bovinos encontradas nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	35
Figura 12.	Tipos de terrenos encontrados nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	37
Figura 13.	Doenças relatadas nos ovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	37
Figura 14.	Doenças relatadas nos bovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.....	39
Figura 15.	Municípios com Língua Azul nas mesorregiões sudoeste e sudeste do Estado do Rio Grande do Sul, 1999.....	43

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas  
µL: Microlitro  
ATCC: American Type Culture Collection  
B-ELISA: Ensaio Imunoenzimático de Bloqueio  
BHK: Baby hamsters kidney – linhagem celular contínua de hamster jovem  
BSA: Albumina sérica bovina  
BVD: Diarréia viral bovina  
CCL: Certified cell lines  
cDNA: Ácido dextribonucléico complementar  
C-ELISA: Ensaio Imunoenzimático de competição  
CPFA: Centro Panamericano de Febre Aftosa  
CsCl<sub>2</sub>: Cloreto de céσιο  
DDA: Dupla difusão em ágar  
DMVP-EV (UFMG): Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.  
ECP: Efeito citopático  
EHDV: Doença hemorrágica dos veados  
EUA: Estados Unidos da América  
FA: Febre aftosa  
g: Gravidade  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina  
IDGA: Imunodifusão em gel de ágar  
IP: Inibição de placas  
kDa: Quilo daltons  
Km<sup>2</sup>: Quilômetros quadrados  
LA: Língua Azul  
M: Molar  
MEM: Minimum Essential Medium  
mL: Mililitro  
mm: milímetros  
Mw: Peso molecular  
NaCl: Cloreto de sódio  
NMWP: Peso molecular/nanômetro  
NS: Proteínas não estruturais  
OIE: Office International Epizooties  
Pa: Antígeno padrão  
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida  
PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoreto  
RNA: Ácido ribonucléico  
RPM: Rotações por minuto  
SCP: Soro controle positivo  
SDS: Duodecilsulfato de sódio  
SFB: Soro Fetal Bovino  
SN: Soroneutralização  
TCID<sub>50</sub>/mL: Dose infectante em cultura de tecido  
v/v: Volume por volume  
VERO: African green monkey kidney - Células de macaco verde africano  
VLA: vírus da Língua Azul  
VMRD: Veterinary Medical Research and Development  
VP: Proteínas estruturais

## RESUMO

No presente estudo, foi produzido e padronizado um antígeno para o teste de Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA) para detecção de anticorpos precipitantes anti-Vírus da Língua Azul. Este antígeno foi utilizado para testar 1272 soros de bovinos e 1341 de ovinos provenientes das Mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul, encontrando-se uma prevalência de 0,63% e 0,15% para bovinos e ovinos, respectivamente.

Palavras-chave: Língua Azul, IDGA, prevalência, bovinos, ovinos.

## ABSTRACT

In the present study, a standard antigen was produced and obtained for an Agar gel Immunodiffusion (AGID) test to detect precipitating antibodies anti-Bluetongue. This antigen was used to test cattle sera (1272) and sheep sera (1341) from the Southwest and Southeast regions of Rio Grande do Sul state. It was found a prevalence for bovines and ovines of 0,63% and 0,15%, respectively.

Keywords: Bluetongue, AGID, prevalence, cattle, sheep.

## 1 INTRODUÇÃO

A Língua Azul (LA) é uma doença viral, não contagiosa, transmitida por mosquitos do gênero *Culicoides*. Todos os ruminantes domésticos e selvagens são susceptíveis à infecção pelo vírus da Língua Azul (VLA), porém a ocorrência da doença clínica tem sido demonstrada principalmente nos ovinos (Parsonson, 1992).

O VLA é membro do gênero *Orbivirus*, família *Reoviridae* e até hoje foram descritos 24 sorotipos em países localizados nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Seu genoma (18 x 10 kDa) consiste de dez segmentos de RNA fita dupla sendo três segmentos grandes (L 1-3), três médios (M 4-6) e quatro pequenos (S 7-10). Possui simetria icosaédrica, diâmetro de 65-70 nm, coeficiente de sedimentação de 550 S e densidade de flutuação em  $CsCl_2$  de 1,36-1,38  $g/cm^3$ . O VLA não possui envelope lipídico e é formado por duas camadas protéicas concêntricas. A camada interna, é composta de cinco proteínas estruturais (VP<sub>1</sub>, VP<sub>3</sub>, VP<sub>4</sub>, VP<sub>6</sub> e VP<sub>7</sub>) e a camada mais externa de duas proteínas (VP<sub>2</sub> e VP<sub>5</sub>). Três proteínas não estruturais NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub> e NS<sub>3</sub> são produzidas durante a replicação viral nas células infectadas. NS<sub>1</sub> e NS<sub>2</sub> são sintetizadas abundantemente enquanto que NS<sub>3</sub> é dificilmente detectada. A seqüência de todas as proteínas não estruturais é altamente conservada entre os sorotipos, enquanto que das proteínas mais externas, principalmente VP<sub>2</sub> e VP<sub>5</sub>, são variáveis (Roy, 1989).

A distribuição da infecção no mundo está descrita na zona climática de 40°N e 35°S onde a população de ovelhas é de aproximadamente 830.000.000 cabeças ou 70,7% do total de ovelhas do mundo (Parsonson, 1992).

Na Figura 1, observamos os ecossistemas que representam a ocorrência do VLA, divididos em

ZONA ENDÊMICA	ZONA EPIENDÊMICA	ZONA LIVRE
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta prevalência</li> <li>Sintomatologia clínica rara</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baixa prevalência</li> <li>Doença esporádica</li> <li>Surtos localizados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Animais soronegativos</li> </ul>

Figura 1. Ecossistemas da LA.

três zonas; com o objetivo de facilitar a análise da epidemiologia da doença. Nas zonas endêmicas a infecção é comum e evidenciada por alta prevalência de soropositivos, mas o aparecimento da doença clínica é raro, devido à presença de grande número de animais imunes. O vírus pode ser isolado de vetores ou de animais virêmicos. Nas zonas epiendêmicas o número de animais com anticorpos contra a doença pode variar e geralmente é focal. Nestas áreas, surtos esporádicos podem ocorrer. Na zona livre, os animais são negativos e não há doença clínica.

Estas zonas são dinâmicas e representam o resultado da interação vírus/hospedeiro/vetor/ambiente.

Em ovelhas, a sintomatologia clínica pode apresentar-se nas seguintes formas: edema da face, febre, corrimento nasal com aparecimento de crostas, vesículas na boca e lábios, inflamação do rodete coronário, claudicação, degeneração hialina da musculatura esquelética, aumento dos linfonodos mediastínicos, anorexia, perda de peso e morte. Problemas reprodutivos também são descritos, como aborto, má formação congênita ou teratogênias (Radostits et al., 1994).

Os bovinos, na maioria das vezes, não apresentam sintomatologia clínica. Perda de peso e queda na produção de leite podem ser observados. 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, a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia bovina a vírus (BVD), febre aftosa (FA), estomatite vesicular e micótica, febre catarral maligna e fotossensibilização (Hourigan e Klingsporn, 1975).

As perdas econômicas diretas causadas pela LA são ainda uma grande incógnita e poucos estudos têm sido feito, embora a importância dessa doença na pecuária e na conservação da vida selvagem já tenha sido relatada (Gibbs, 1988). Perdas indiretas estão relacionadas com a dificuldade de qualificação para a exportação de animais e sêmen, tornando-se grande entrave para o comércio entre os países do Mercosul, EUA e Europa (O.I.E., 1999 e Normas Sanitárias-Resolução N°66/94).

No Brasil, de acordo com levantamentos sorológicos realizados em vários estados, o VLA está amplamente difundido geograficamente entre as espécies bovina, caprina, bubalina e ovina. Pelos dados obtidos com a sorologia e pela falta de relatos de casos clínicos da doença no campo nas diferentes espécies que se apresentam soropositivas, tudo indica que a LA espalha-se pelos rebanhos do país de forma silenciosa (Cunha, 1988).

Condições de temperatura e umidade na maior parte do país favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores, facilitando a endemicidade da doença, tornando grande parte da população de ruminantes imunes à infecção pelos sorotipos presentes na área (Lobato, 1996).

O Brasil possui hoje cerca de 13.954.555 milhões de ovinos e um rebanho bovino de 153.058.275 milhões de cabeças. Entre os estados criadores destes animais destaca-se o Rio Grande do Sul que detém 37% do rebanho brasileiro de ovinos e 9% dos bovinos do país. Na região sul do estado concentram-se os maiores criatórios de ovinos (IBGE, 1996).

Baseado na importância desta região para ovinocultura brasileira e considerando a importância da LA nas espécies ovina e bovina, foi proposto neste trabalho o início de um estudo da situação desta doença na região. Inicialmente, foi produzido e padronizado o antígeno de LA para utilizá-lo na prova de IDGA que é o teste padrão para detectar anticorpos anti-VLA, de acordo com a OIE (1999). O antígeno produzido foi utilizado para testar soros de ovinos e bovinos provenientes das mesorregiões sudeste e sudoeste do Rio Grande do Sul.

Os objetivos deste trabalho foram:

- Produzir e padronizar antígeno para a prova de Imunodifusão em Gel de Ágar para diagnóstico sorológico da Língua Azul.
- Determinar a soroprevalência da Língua Azul em ovinos e bovinos das mesorregiões sudoeste e sudeste do Estado do Rio Grande do Sul.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1. IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR

Jochim & Chow (1969), desenvolveram pela primeira vez o teste de IDGA para detectar anticorpos soro-específicos em bovinos e outros ruminantes domésticos suspeitos de infecção com o VLA. Pearson & Jochim (1979), utilizaram a técnica de dupla difusão em ágar (DDA), para detecção de anticorpos precipitantes contra o VLA.

O teste de IDGA é reconhecido por ser sensível (Della-Porta et al., 1983; Littlejohns e Burton, 1988; Littlejohns et al., 1988; Pearson et al., 1992), mas suas desvantagens incluem a falta de quantificação de anticorpos, o tempo necessário para realização e a baixa especificidade (Pearson et al., 1992).

A baixa especificidade do teste tem sido atribuída às reações cruzadas causadas por outros Orbivirus, incluindo aqueles do sorogrupo do Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica dos Veados (EHDV) e talvez dos vírus pertencentes ao sorogrupo Palyam e Eubenangee (Della-Porta et al., 1985 e Afshar, 1994). Na Austrália, as reações cruzadas pelo sorogrupo do EHDV são consideradas as mais importantes em relação à falsa positividade do teste de IDGA e da interpretação de seus resultados do mesmo (Della-Porta et al., 1985).

O teste IDGA tem sido utilizado extensivamente no diagnóstico, na vigilância e para emissão de certificados de trânsito, cujos rebanhos são destinados para exportações. É um teste simples de ser realizado, econômico, confiável e reproduzível (Della-Porta et al., 1983, Della-Porta et al., 1985; Pearson et al., 1992).

Ward et al. (1995) realizaram estudo para avaliar o teste de IDGA em bovinos infectados com VLA em Queensland, Austrália, e observaram, que os anticorpos precipitantes detectados, não persistem tanto quanto os anticorpos neutralizantes na ausência de reinfeção com o VLA. Concluíram que o teste de IDGA deve ser usado preferencialmente para levantamentos epidemiológicos através de sorologia e para vigilância sanitária.

## 2.2. OUTROS TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA LÍNGUA AZUL

Os testes ELISA de bloqueio (B-ELISA), também referida como ELISA de competição (C-ELISA) foram desenvolvidos na tentativa de resolver o problema das reações cruzadas obtidas através do IDGA em relação aos outros membros do gênero Orbivirus (Pearson et al., 1992).

O teste B-ELISA utilizando-se como anticorpo competitivo um anticorpo monoclonal anti a proteína VP7 do VLA, é atualmente o método recomendado pela O.I.E para sorologia. Porém, apesar de mais sensível e específico, este método ainda não é tão utilizado quanto o IDGA devido a sua maior complexidade e menor disponibilidade de kits comerciais (Martyn et al., 1990).

Arita et al. (1992), comparando a imunofluorescência indireta com o IDGA para o diagnóstico da LA, concluíram que, as duas técnicas podem ser utilizadas na rotina para estudos epidemiológicos da doença. Entretanto, a imunofluorescência indireta tem a vantagem de quantificar anticorpos e detectar antígenos virais em células de linhagem contínua infectadas com LA.

Entre os testes mais utilizados para detecção de anticorpos neutralizantes e sorotipificação estão os de soroneutralização em microplacas (SN) e a inibição de placas (IP). Os testes de neutralização são capazes de identificar infecção por sorotipos específicos e possuem alta sensibilidade e especificidade requerendo geralmente 3-5 dias para se obter o resultado. Porém reações cruzadas podem ocorrer entre os vários sorotipos de LA existentes (Gard e Kirkland, 1993).

## 2.3 PRODUÇÃO DE ANTÍGENO PARA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR

Arita et al. (1993), produziram antígeno solúvel, para IDGA, através da inoculação do sorotipo 4 do VLA em células de linhagem contínua de células de macaco verde africano jovem (VERO). Nesse trabalho, os autores, revelaram que a provável proteína responsável pela reação de precipitação no teste de IDGA foi NS<sub>1</sub>, com peso molecular igual a 60kDa.

Gard e Kirkland (1993), produziram antígeno através da inoculação em linhagens de células VERO e BHK, e descreveram a clarificação da suspensão viral feita com Tris-HCl a 1M e  $\beta$ -propiolactona para inativação do antígeno concentrado.

Reis e Leite (1994), produziram antígeno do vírus da anemia infecciosa equina para o teste de IDGA. Nesse trabalho, utilizaram o PMSF como inibidor de proteinase para testar a estabilidade do antígeno produzido em diferentes temperaturas de armazenagem e concluíram que a sua adição garantiu maior estabilidade nas diferentes temperaturas testadas.

## 2.4 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TESTE DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR

Huismans e Els (1979) e Eaton et al. (1988), relataram que os anti-soros das infecções por VLA com diferentes sorotipos são conhecidos por conter anticorpos para NS<sub>1</sub>.

Mechan et al. (1986), utilizando anti-soro policlonal confirmaram a relação antigênica das proteínas não estruturais NS<sub>1</sub> e NS<sub>2</sub> e da proteína estrutural VP<sub>7</sub>.

Segundo Roy (1996), a proteína estrutural NS1 é sintetizada em maior quantidade que qualquer outra proteína constituinte do VLA e pode ser utilizada como reagente no diagnóstico grupo-específico pelo teste de IDGA.

Gorman (1992), discute a semelhança entre os diferentes sorogrupos de Orbivirus, comparando a seqüência de nucleotídeos e/ou aminoácidos dos mesmos para diferentes proteínas. O autor relaciona ainda estas diferenças com a distribuição das seqüências de nucleotídeos destas amostras.

## 2.5 DISTRIBUIÇÃO DA LÍNGUA AZUL E DO VETOR CULICOIDES NO MUNDO E NO BRASIL

A distribuição geográfica do VLA se expande nas áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. Apenas a Europa é hoje considerada livre da doença, apesar de, no passado, epidemias na Península Ibérica terem sido reportadas com isolamentos do vírus (Gibbs e Greinner, 1988).

No Brasil, a LA foi descrita primeiramente por Silva (1978), que identificou a presença de anticorpos fixadores de complemento contra o VLA em bovinos e ovinos no estado de São Paulo. Os sorotipos envolvidos foram identificados na África do Sul pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Onderstepoort através de testes de neutralização, sendo eles: 1, 2, 4, 6, 10, 12, 13 e 17, para bovinos e 4, para ovinos. Nesse mesmo ano, o Brasil reportou oficialmente à O.I.E evidência sorológica da ocorrência no país, sendo o primeiro país da América do Sul a

identificar a presença do vírus em seus rebanhos (Ministério da Agricultura - Brasil, 1978).

De acordo com a literatura consultada, o VLA nunca foi isolado no Brasil, no entanto, em 1980, 60 bovinos da raça Zebu foram importados pelos EUA e permaneceram na Flórida, em quarentena, por 150 dias. Durante 30 dias entre o último teste destes animais no Brasil e seu primeiro teste na Flórida, quatro animais desenvolveram anticorpos para VLA. Setenta e dois dias após a chegada, mais três animais soroconverteram e um mais no octagésimo sexto dia. Títulos de anticorpos neutralizantes contra os sorotipos 4 e 20, ambos, exóticos para os EUA, foram encontrados. O VLA-4 foi isolado de um destes animais (Campbell e Grocock, 1982).

Com a introdução da técnica de IDGA, vários inquéritos sorológicos foram realizados, demonstrando que o VLA encontra-se distribuído por todo território brasileiro em bovinos e outros ruminantes (Tab. 1).

Tabela 1. Anticorpos anti-VLA detectados em vários estados do Brasil, por IDGA.

Autor(es)	Estado	Nº amostras testadas	% Soro-positivos	Espécie
Moreira et al. (1980)	MG	577	74,0	Bovina
Cunha et al. (1982)	RJ	553	40,9	Bovina
Abreu (1982)	RR	1472	16,0	Bovina
	AM	92	25,5	Bovina
	PA	117	32,5	Bovina
	AP	360	21,3	Bovina
	AP	141	19,5	Bubalina
Abreu et al. (1984)	RJ	388	14,9	Caprina
Cunha et al. (1987)	PR	106	19,8	Bovina
	SP	214	53,7	Bovina
	SC	174	37,3	Bovina
	RS	409	1,2	Bovina
	RJ	593	44,1	Caprina
Cunha et al. (1988)	RJ	33	24,2	Ovina
	MG	340	5,9	Caprina
Brown et al. (1989)	Nordeste	76	1,5	Caprina
Castro et al. (1992)	MG	451	76,3	Bovina
Arita et al. (1992)	SP	190	50,5	Bovina
	SP	72	52,7	Ovina
Lage et al. (1996)	MG	329	54,4	Bubalina
Melo et al. (1997)	Sergipe	97	89,7	Bovina
Melo et al. (1997)	Paraíba	137	4,4	Bovina

Com o objetivo de conhecer os sorotipos existentes no Brasil, Cunha (1990) enviou para os laboratórios de Plum Island, EUA, 174 soros positivos testados por IDGA, provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e do sul do Brasil. Desses, 24 foram sorotipificados pela soroneutralização, sendo onze de bovinos, onze de caprinos e dois de ovinos. O resultado indicou que vários sorotipos podem estar presentes no Brasil, mas os sorotipos 4, 6 14, 17 e 19 parecem ser os mais difundidos.

Forattini (1957) e Wirth (1974), estudaram mosquitos *Culicoides* das espécies *C. insignis*, *C. paraensis* e *C. furens*. Observaram que estes encontravam-se distribuídos desde o leste dos EUA até o sul do Brasil. Como exemplo, o *C. insignis* foi localizado em Jacksonville, Flórida, bem como em Pelotas, RS.

Várias espécies de *Culicoides*, de comprovada competência na transmissão da LA, se alimentam preferencialmente em bovinos do que em ovinos, tais como: *C. brevitarsis*, *C. vadai* e *C. fulvus*. Devido a esse fator associado a uma prolongada viremia que ocorre nos bovinos, alguns autores têm sugerido que os bovinos poderiam funcionar como reservatórios do vírus durante as estações mais frias, onde o número de vetores é menor (Gibbs e Greinner, 1988).

Ward (1996) pesquisou a associação da ocorrência do VLA em rebanhos bovinos com os fatores climáticos e observou estreita relação entre os fatores climáticos e a ocorrência da infecção pelo VLA. Entre esses fatores salientam-se a temperatura, umidade, vento e intensidade de luz, que também estão relacionados à atividade das espécies de *Culicoides* transmissoras do VLA.

Os *Culicoides* se multiplicam em regiões alagadas com alto grau de matéria orgânica ou em águas limpas de alta salinidade ou alcalinidade. O pico de atividade destes insetos está relacionado com seu ciclo reprodutivo que depende de condições de calor e umidade para reprodução (Lobato, 1999).

Estações do ano como verão favorecem o aparecimento e reprodução dos vetores e conseqüentemente a maior transmissão da doença. A população dos *Culicoides* tende a

baixar no outono e inverno quando a temperatura é mais baixa (Sellers, 1981).

Diferenças entre a sensibilidade de algumas raças à infecção e manifestação de sintomas para LA têm sido descrito. Berry et al. (1982), observaram que algumas raças de ovinos destinados a produção de lã apresentavam diferentes respostas imunes quando inoculadas com vacinas inativadas para LA. Stott et al. (1985), avaliando as respostas humoral e celular de ovinos das raças Warhill e Suffolk, concluíram que a resposta celular avaliada foi observada para todas as ovelhas da raça Warhill e apenas 30% da raça Suffolk.

A LA foi incluída pela O.I.E. na lista "A" de doenças infecciosas que reúne aquelas cujas conseqüências sócio-econômicas podem ser graves e de importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos (O.I.E., 1999). De acordo com a Resolução Federal N°66/94 referente às normas sanitárias para a importação e exportação de animais ovinos entre os Estados parte do Mercosul é obrigatório o IDGA para diagnóstico da LA.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRA VIRAL E CÉLULAS

Vírus da Língua Azul – sorotipo 4 cedido gentilmente pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa (CPFA) foi inoculado e multiplicado inicialmente em BHK-21/C-13 (ATCC/CCL-10) e posteriormente foi adaptado para crescimento em células VERO (ATCC/CCL-81). Foi utilizado meio de crescimento MEM, com 2% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (Penicilina 1% e Estreptomicina 1%) e antifúngico (Anfotericina B) a 0,5%.

#### 3.2. TITULAÇÃO VIRAL

As suspensões virais obtidas foram alíquotadas e tituladas em microplacas de 96 poços por diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ), utilizando-se oito repetições (poços) por coluna. A primeira coluna foi utilizada como controle negativo e as demais, respectivamente, com as diluições decimais da suspensão viral.

Em cada poço da placa foram distribuídos 50  $\mu$ L da suspensão viral correspondente à sua diluição

na coluna da placa, 50 µL do meio de crescimento MEM com 2% de SFB e mais 50 µL de suspensão celular. Antibióticos e antifúngico foram acrescentados ao meio MEM. A placa foi então levada até a estufa contendo 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> a 37°C, onde permaneceu até a sua leitura (96 horas).

O título da suspensão viral foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938), através do número de poços por coluna que apresentaram qualquer ECP.

### 3.3. PRODUÇÃO DO ANTÍGENO

#### 3.3.1. PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL

Para produção da suspensão viral, as monocamadas de células VERO com 90% de confluência celular, cultivadas em garrafas Roller Plástico-Corning com 830 cm<sup>2</sup> de área de cultivo, foram inoculadas com 15 ml da suspensão viral com sorotipo 4 do VLA, apresentando título de 10<sup>5,8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL e incubadas por uma hora em estufa a 37°C. Após esse período foi acrescentado 85 mL de MEM com 2% SFB, antibióticos e antifúngico, e as garrafas incubadas novamente na estufa. Quando o ECP atingiu 90% da monocamada, aproximadamente 48 horas pós inoculação, a garrafa foi congelada a -70°C. Todo o processo da produção da suspensão viral em garrafas roller foi mantido em rotação no aparelho CEL-GRO Rotator\* a 2.0 rpm.

#### 3.3.2. PREPARO DO ANTÍGENO

A produção do antígeno foi feita de acordo com técnicas usadas por Arita et al., (1993) e Gard & Kirkland (1993), com modificações descritas abaixo.

A suspensão viral foi submetido a dois ciclos de congelamento e descongelamento, homogeneizado e clarificado por centrifugação a 10.000 g em centrífuga SORVALL (Rotor SORVALL - GSA 5,75) por 60 minutos a 4°C.

O sobrenadante do centrifugado foi concentrado 40 vezes no aparelho AMICON 8200 (Modelo CDS10 - Concentration/Dialysis Selector) por filtração tangencial, utilizando-se membrana Millipore YM10, com ponto de corte 10.000 MW e mantido em banho de gelo.

Uma parte do antígeno obtido por ultrafiltração foi aliquoteado em tubos e a outra, submetida a ultra-centrifugação a 100.000 g por 60 minutos a 4°C, na centrífuga SORVALL-Internacional (Rotor SW 50.1 - BECKMAN). O sobrenadante obtido foi referido como antígeno ultra-centrifugado.

#### 3.3.3. ARMAZENAMENTO DO ANTÍGENO PRODUZIDO

A uma parte do antígeno produzido foi acrescentado fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF)\*\* , que é um inibidor de proteinase, na concentração de 1 mM diluído em metanol, e a outra parte permaneceu sem alteração.

Os antígenos com e sem PMSF foram aliquoteados e armazenados a diferentes temperaturas de conservação (4°C, -20°C e -70°C), para testar a estabilidade dos mesmos nas diferentes temperaturas.

#### 3.4. DOSAGEM PROTÉICA DO ANTÍGENO PRODUZIDO

A dosagem do antígeno produzido foi realizada pelo método do Biureto de proteínas totais (Modificado), utilizando o Kit comercial (KIT-DOLES reagentes).

#### 3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Através da eletroforese, foram analisados, suspensão celular e viral, desprezado do ultra-centrifugado e antígenos produzidos, antígeno do Kit VRMD e CPFA, aplicando-se 10µg de proteína por canaleta.

Para realização da técnica, as amostras foram separadas em SDS-PAGE (gel de poliacrilamida contendo Duodecilsulfato de sódio) em placa vertical do minigel de poliacrilamida (Mini-Protean®II da BIO-RAD), segundo descrito por Laemmli (1970). O gel de resolução utilizado para análise das amostras foi de 12% e o de empilhamento de 4%.

\*Lab-line®

\*\*Sigma®

### 3.6. COLORAÇÃO PELA PRATA

Após eletroforese e rápida lavagem em água destilada, o gel foi fixado em solução de metanol 40% por 30 minutos e em etanol 40% por 20 minutos. Foi transferido para solução oxidante (dicromato de potássio 1% e ácido nítrico 0,2%, diluído em água) por 10 minutos e lavada em água deionizada. Solução de prata a 0,2% foi adicionada ao gel em câmara escura por 30 minutos. Após nova lavagem em água deionizada o gel foi transferido para a solução reveladora por 30 minutos. Após o aparecimento das bandas, imediatamente, adicionou-se a solução de ácido acético 10% (solução "Stop").

### 3.7. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE E ESTABILIDADE DO ANTÍGENO

O antígeno produzido concentrado 40 vezes foi avaliado no dia da produção, um mês e dois meses após, armazenado em diferentes temperaturas de conservação (4°C, -20°C e -70°C), utilizando como controle o antígeno padrão Bluetongue Antibody Test Kit (Veterinary Medical Research and Development - VMRD) armazenado a 4°C, para verificar se o efeito da adição ou não do PMSF, o tempo e a temperatura de conservação influenciariam na estabilidade. Para isto, o antígeno e o soro controle positivo (SCP) foram simultaneamente diluídos. A linha de precipitação formada entre as diluições do antígeno e anticorpo representaram a reatividade dos antígenos testados (Fig. 2).

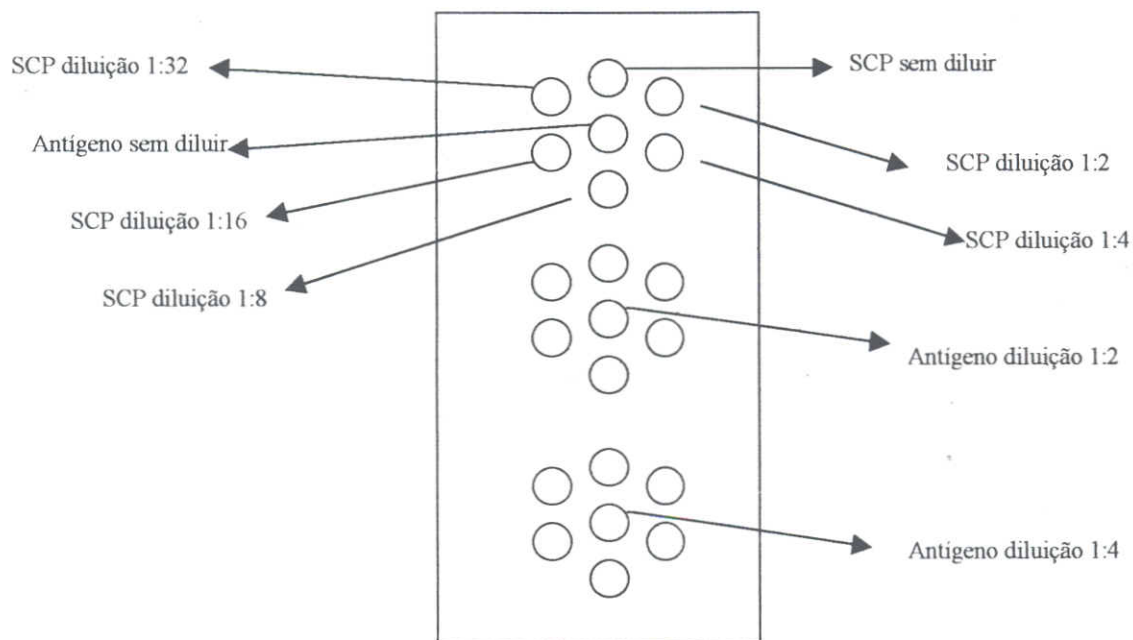


Figura 2. Titulação do antígeno.

O SCP utilizado foi previamente testado frente ao antígeno do Kit-VMRD, e apresentou linha de precipitação até a diluição 1:16.

### 3.8. ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM BOVINOS E OVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

#### 3.8.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA E DA POPULAÇÃO OVINA E BOVINA DO RIO GRANDE DO SUL

O Estado do Rio Grande do Sul localiza-se na região sul do Brasil e ocupa uma extensão territorial de 282.062 km<sup>2</sup>, dividida em 427 municípios e sete mesoregiões (Tab. 2 e Fig. 3).

O efetivo de ovinos é composto de 5.081.387 cabeças (IBGE, 1996), caracterizado pelo sistema extensivo (74,64%), em duas mesorregiões sudeste e sudoeste, permanecendo os ovinos todo o tempo em convívio harmônico nos mesmos pastos e aguadas dos bovinos.

Os bovinos e os ovinos não recebem nenhum suplemento alimentar. Eventualmente, alguns rebanhos têm acesso a pastagens artificiais cultivadas na estação de inverno, formadas principalmente por forrageiras e no verão, as leguminosas. Os estabelecimentos mantêm as criações de ovinos e bovinos nas mesmas áreas, na proporção de um ovino para 1,6 bovinos. Dessa forma, facilitam o manejo seletivo das pastagens nativas.

As mesorregiões um, dois, três, quatro e cinco correspondem a 25,36% do total de ovinos do Estado (Tab. 3 e Fig. 4). São caracterizadas por propriedades com exploração agrícola, onde os ovinos são criados em pequenas áreas do estabelecimento nas proximidades das residências.

Estas mesorregiões foram divididas de acordo com a estrutura Político-administrativas do Rio Grande do Sul, correlacionadas à atividade agropecuária desenvolvida na região (IBGE, 1996).

Tabela 2. Distribuição das Mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul, 1999.

Nº da região	Mesorregião Geográfica
1	Centro Ocidental Rio-Grandense
2	Centro Oriental Rio-Grandense
3	Metropolitana de Porto Alegre
4	Nordeste Rio-Grandense
5	Noroeste Rio-Grandense
6	Sudeste Rio-Grandense
7	Sudoeste Rio-Grandense

Tabela 3. Distribuição dos rebanhos de ovinos e bovinos no Estado do Rio Grande do Sul por mesorregião, 1999.

Mesorregião	Nº mun.	%*	Nº ovinos	%**	Nº bovinos	%***
1	25	5,85	510.286	10,04	1.646.772	12,45
2	40	9,35	129.604	2,55	893.508	6,76
3	88	20,60	160.405	3,16	937.641	7,10
4	47	11,00	104.882	2,06	929.564	7,05
5	192	45,00	382.863	7,55	2.799.202	21,15
6	20	4,70	1.101.002	21,65	1.993.718	15,08
7	15	3,50	2.692.345	52,99	4.020.901	30,41
TOTAL	427	100,00	5.081.387	100,00	13.221.306	100,00

\* Porcentagem de municípios das mesorregiões em relação ao total de municípios do Estado do Rio Grande do Sul.

\*\* Porcentagem de ovinos das mesorregiões em relação ao total do Estado do Rio Grande do Sul.

\*\*\* Porcentagem de bovinos das mesorregiões em relação ao total do Estado do Rio Grande do Sul.

Fonte: IBGE 1996

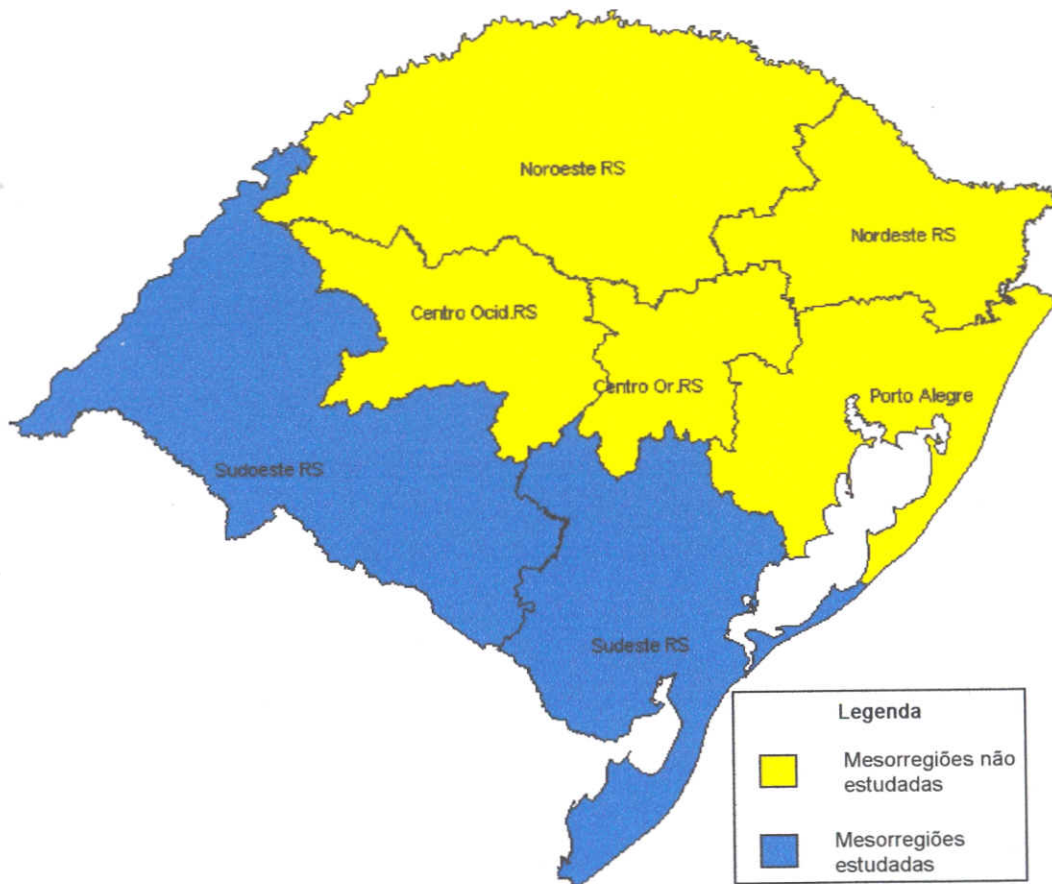


Figura 3. Mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul, segundo IBGE (1996).

### 3.8.2. REGIÃO ESTUDADA

A região estudada divide-se em duas Mesorregiões: Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense. Essas são formadas por 35 municípios, concentrando-se os maiores criatórios de ovinos do Estado do Rio Grande do

Sul (IBGE, 1996). Nestas regiões concentram-se, respectivamente, 74,64% dos ovinos e 45,49% dos bovinos existentes no estado. Dos 35 municípios, somente de 18 foram coletados amostras (Fig. 4), conforme metodologia descrita no item 3.8.4 Estratificação.

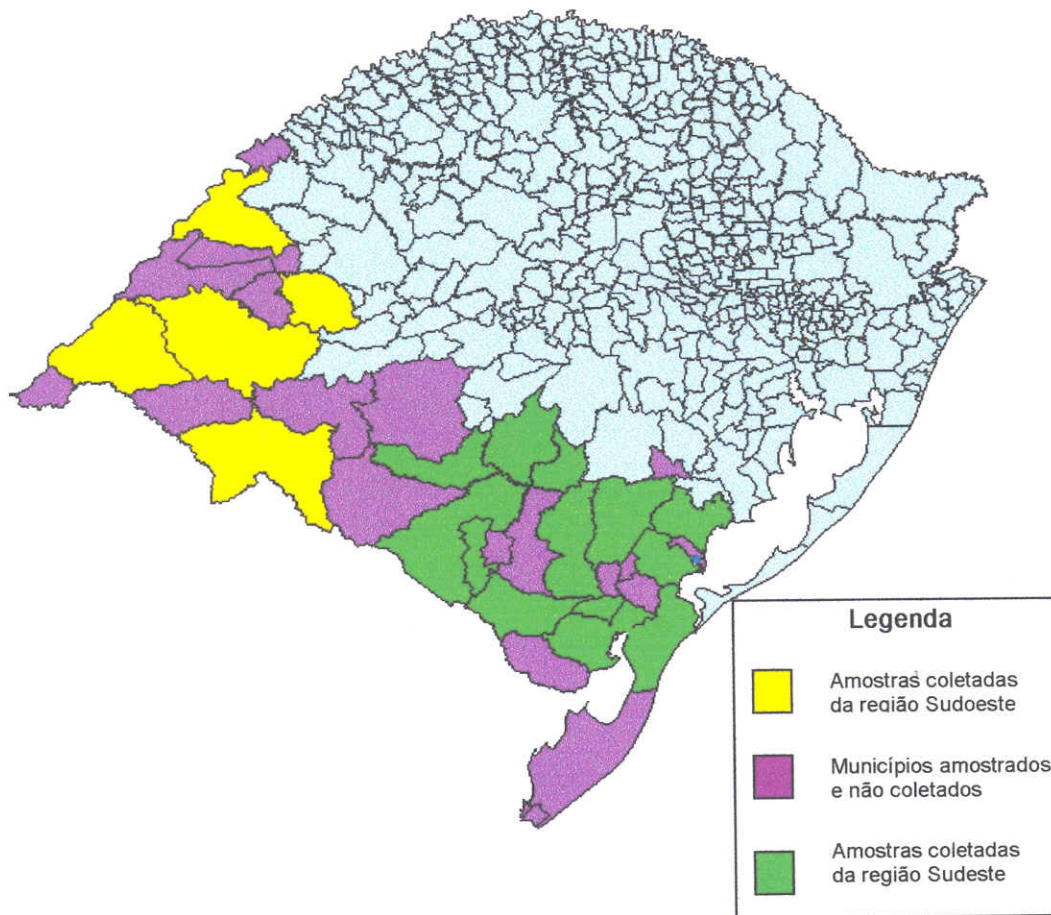


Figura 4. Municípios do Estado do Rio Grande do Sul onde foram amostradas e coletados soros de bovinos e ovinos, 1999.

### 3.8.3. TAMANHO DA AMOSTRA

O número de amostras de soros de ovinos e bovinos foi calculado estatisticamente de acordo com os procedimentos recomendados pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1979), por conglomerados, com prevalência esperada de 5% para ovinos e 5% para os bovinos, com grau de confiança de 90% e erro amostral de 20%: onde:

$$N = \frac{p \times (100 - p) \times z^2}{\left(\frac{p \times d}{100}\right)^2}$$

N = tamanho da amostra  
 p = prevalência esperada  
 z = grau de confiança  
 d = margem de erro esperada

Valores estimados:

p = 5% para ovinos e 5% para bovinos  
 d = 20%  
 z = 90% (1,64)

### 3.8.4. ESTRATIFICAÇÃO

Como universo amostral coletou-se 1331 soros de ovinos e 1272 soros bovinos, em 18

municípios descritos na Tabela 4. Foram representados 135 estabelecimentos para ovinos e 128 para bovinos, cada um sendo considerado uma unidade amostral. O número de estabelecimentos que foi coletado, em cada município, foi previamente determinado. Com base no rebanho ovino, cada unidade amostral foi representada por um intervalo de 12 mil cabeças de ovinos.

A partir do momento do sorteio dos municípios com representatividade, consultou-se as fichas dos produtores arquivadas nas Inspetorias Veterinárias e Zootécnicas da Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul onde foram obtidas a lista de todos os estabelecimentos rurais.

Nos municípios que apresentaram mais de um estabelecimento sorteado, as propriedades estudadas obedeceram uma distribuição geográfica geométrica de quadrantes proporcionais e, por conglomerados, foram sorteadas as propriedades.

As amostras foram estratificadas segundo a composição do rebanho em: ovinos (90% ovelhas, 10% de carneiros) com idade superior a um ano e bovinos (90 % de vacas e 10% de touros) com idade superior a 2,5 anos.

Tabela 4. Municípios das mesorregiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul onde foram coletados soros de ovinos e bovinos com respectivas unidades amostrais, 1999.

Município	Ovinos	Bovinos	Nº propriedades amostradas	Mesorregião
Alegrete	298	300	30	Sudoeste
Arroio Grande	40	39	4	Sudeste
Bagé	110	120	12	Sudoeste
Caçapava do Sul	49	0	5	Sudeste
Canguçu	40	34	4	Sudeste
Herval	130	119	13	Sudeste
Hulha Negra	10	10	1	Sudoeste
Lavras do Sul	46	50	5	Sudoeste
Pedro Osório	20	20	2	Sudeste
Pelotas	10	10	1	Sudeste
Piratini	50	50	5	Sudeste
Rio Grande	20	20	2	Sudeste
Santana da Boa Vista	40	40	4	Sudeste
Santana do Livramento	140	140	14	Sudoeste
São Borja	50	50	5	Sudoeste
São Francisco de Assis	30	30	3	Sudoeste
São Lourenço do Sul	10	10	1	Sudeste
Uruguaiana	238	230	24	Sudoeste
TOTAL	1341	1272	135	

### 3.9. COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue dos ovinos foram colhidas por venopunção da jugular, após tosquia e assepsia do local a ser puncionado. Nos bovinos, após a assepsia da região ano-caudal as amostras de sangue foram coletadas por venopunção coccígea.

Utilizou-se tubos com vácuo estéreis, 7 x 100 mm, com agulhas múltiplas (21 G x 1"), descartáveis e adaptadas em suporte. Em seguida, cada tubo foi inclinado 45° por um período de uma hora, em temperatura ambiente para a dessoragem completa. Em seguida, os tubos foram centrifugados (7000 x g) por período de 10 minutos e o sobrenadante (soro) foi transferido com auxílio de uma pipeta automática com capacidade de 1000 µl para um frasco plástico, esterilizado, com capacidade de 5 ml. O soro alíquotado foi devidamente identificado quanto à região pertencente, numerado e estocado a -20°C, até o processamento das amostras no Laboratório de Virologia Animal do DMVP-EV da UFMG.

### 3.10. QUESTIONÁRIO

Foram realizados 128 questionários nas propriedades rurais coletadas, com o objetivo de verificarmos algumas características do tipo de criação das propriedades estudadas, tais como: raças dos ovinos e bovinos, sistema de criação, tipo de exploração para bovinos (carne e leite) e ovinos (carne, lã ou misto), tipo de terreno das propriedades (seco, alagadiço ou misto) e principais doenças observadas nos rebanhos bovinos e ovinos (Anexo I).

### 3.11. PROVA SOROLÓGICA PARA DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL NO RIO GRANDE DO SUL

Para detecção de anticorpos precipitantes contra o vírus da Língua Azul, foi utilizada a Técnica de dupla difusão em ágar (DDA), segundo Pearson & Jochim (1979).

Foi utilizado solução de NaCl a 0,85% e agarose na concentração final de 0,9% diluída em água destilada e deionizada.

Para fluidificação, a agarose foi levada ao banho-maria até completa homogeneização dos componentes. Sobre as lâminas previamente desengorduradas e secas, foi colocado 4,5 ml da solução. Após a solidificação, as lâminas foram armazenadas por 24 horas na câmara úmida para estabilização do gel.

Foram feitos orifícios no ágar com furador de sete furos de 3 mm de diâmetro com 2,4 mm de distância entre os poços. O antígeno foi colocado no poço central e o soro controle positivo nos poços 1 e 4 da roseta (30 µl em cada poço). Nos quatro poços restantes foram colocados os soros a serem testados (Fig. 2).

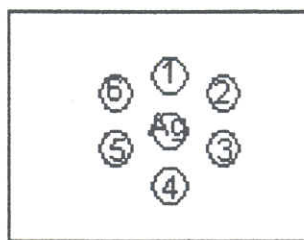


Figura 5. Mapa de distribuição do antígeno (Centro), soro controle positivo (1 e 4) e amostras de campo (2,3,5 e 6) na lâmina.

As lâminas permaneceram em câmara umedecida (com azida sódica a 1%) por 48 horas em temperatura ambiente. Foram, então, observadas através de luz indireta e fundo escuro as linhas de precipitação, formadas entre o antígeno e o anticorpo. Os resultados encontrados podem variar de acordo com a concentração das amostras testadas. A identidade da linha formada com o soro controle positivo foi a base para leitura do teste.

O antígeno e o soro controle positivo utilizados para as provas sorológicas, foram respectivamente, o antígeno produzido e concentrado 40 vezes na Escola de Veterinária da UFMG e "pool" de soros positivos testados e titulados frente ao antígeno padrão VMRD.

#### 4 RESULTADOS

##### 4.1. COMPARAÇÃO ENTRE OS ANTÍGENOS CONCENTRADO E CONCENTRADO/ULTRA-CENTRIFUGADO

O antígeno concentrado 40 vezes apresentou linhas de precipitação idênticas ao antígeno concentrado e ultra-centrifugado no SCP e os mesmos apresentaram resultados idênticos quando comparados ao antígeno do kit VRMD, através do teste de IDGA.

Para realização das provas sorológicas utilizou-se, então, o antígeno somente concentrado e não ultra-centrifugado.

##### 4.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para comparação das proteínas presentes nos antígenos do kit VRMD, CPFA e do antígeno

produzido concentrado 40 vezes utilizou-se o SDS-PAGE com o objetivo de verificar os padrões das bandas dos mesmos.

Os resultados obtidos na eletroforese das amostras são mostrados na Figura 6.

De acordo com análise da Figura 6, observamos que as bandas evidenciadas nas canaletas 3, 4 e 5 referentes aos antígenos produzido, Kit VRMD e CPFA possuem padrão semelhante, apesar da amostra da canaleta 3 apresentar menor concentração de proteínas.

As bandas observadas na canaleta 6 devem-se provavelmente à proteínas constituintes do SFB, uma vez que nenhuma outra proteína foi visualizada e seu peso é muito próximo de 60 kDa.

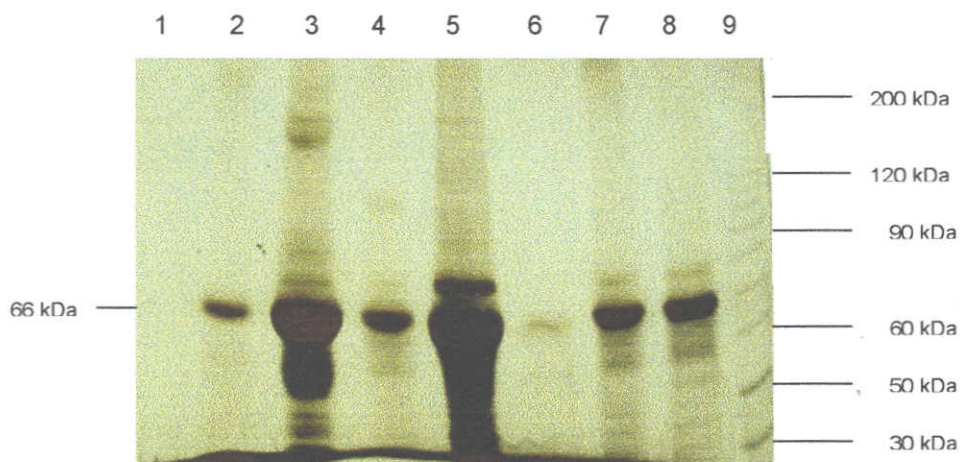


Figura 6. Eletroforese em minigel de poliacrilamida, corado pela prata. Amostras: (1) Tampão de corrida; (2) Albumina sérica bovina; (3) Antígeno produzido concentrado 40 vezes por ultra filtração tangencial; (4) Antígeno VRMD; (5) Antígeno CPFA; (6) Desprezado do ultra-concentrado; (7) Suspensão viral (Sorotipo 4 -VLA); (8) Suspensão celular (VERO) com SFB; (9) Padrão de peso molecular GIBCO® (PM).

##### 4.3. REATIVIDADE X ESTABILIDADE DO ANTÍGENO PRODUZIDO

De acordo com o item 3.7, os resultados encontrados na avaliação da reatividade do antígeno foram os seguintes, representada pela maior diluição onde se observou linha de precipitação:

No dia da produção, a adição do PMSF não demonstrou diferença nos resultados obtidos entre as linhas de precipitação formadas em relação aos antígenos sem PMSF mantidos a 4°C, bruto, diluído duas ou quatro vezes. Porém, o antígeno produzido com e sem PMSF foi superior ao antígeno padrão, quando bruto e diluído duas vezes (Tab. 5).

O antígeno bruto, um mês após a produção, não apresentou queda na potência em relação ao dia da produção em nenhuma das temperaturas em que os mesmos foram armazenados, independente da presença do PMSF. Já em relação ao segundo mês após a produção, o antígeno bruto com e sem PMSF apresentou queda na sua reatividade (Tab. 6).

O antígeno diluído duas vezes, um mês após a produção manteve-se estável em todas as temperaturas de armazenamento testadas, independente da presença do PMSF. Dois meses

após a produção, observou-se uma queda na reatividade do antígeno produzido em todas as temperaturas testadas, porém mais acentuada para o antígeno armazenado a 4°C sem PMSF (Tab. 7).

Estes resultados indicam que o antígeno armazenado com PMSF mostrou-se mais reativo em relação ao sem PMSF nos dois meses testados frente ao antígeno padrão. Porém, a temperatura de -70°C é que determinou a maior estabilidade para ambos os antígenos.

Tabela 5. Reatividade do antígeno padrão (Pa) bruto diluído duas e quatro vezes, armazenado a 4°C, comparado ao antígeno produzido com e sem PMSF a 4°C, no dia da produção frente ao soro controle positivo.

Diluições	Ag (Pa)	Ag c/ PMSF	Ag s/ PMSF
Bruto	1:2	1:4	1:4
Diluído 2x	1:4	1:8	1:8
Diluído 4x	1:8	1:8	1:8

Tabela 6. Reatividade do antígeno produzido bruto em diferentes temperaturas de conservação e em diferentes períodos, com e sem PMSF, comparado ao Ag padrão (Pa) armazenado a 4°C frente ao soro controle positivo.

	Ag (Pa)		Ag bruto c/ PMSF			Ag bruto s/ PMSF		
	4°C	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C	
Dia 0	1:2	1:4*	-	-	1:4*	-	-	
1 Mês	1:2	1:4*	1:8*	1:4*	1:8*	1:8*	1:8*	
2 Meses	1:2	1:4*	1:2	1:2	1:2*	1:2*	1:4*	

\* Fraco positivo

Tabela 7. Reatividade do antígeno produzido diluído duas vezes em diferentes temperaturas de conservação e em diferentes períodos, com e sem PMSF, comparado ao Ag padrão (Pa) armazenado a 4°C frente ao soro controle positivo.

	Ag (Pa) diluído 2x		Ag diluído 2x c/ PMSF			Ag diluído 2x s/ PMSF		
	4°C	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C	
Dia 0	1:4*	1:8*	-	-	1:8*	-	-	
1 Mês	1:4*	1:8*	1:8*	1:8*	1:8*	1:8*	1:8*	
2 Meses	1:4*	1:4*	1:4*	1:4	1:2	1:4	1:4	

\* Fraco positivo

#### 4.4. CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES ESTUDADAS

De acordo com o questionário realizado verificou-se que:

A exploração de ovinos mais difundida é a criação mista (Fig. 7).

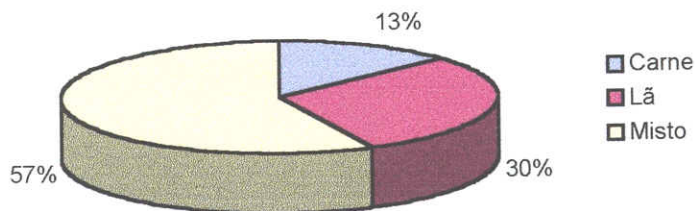


Figura 7. Tipos de explorações para ovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

Em relação aos bovinos, observamos que as propriedades rurais estudadas nas regiões Sudoeste e Sudeste do estado são

predominantemente voltadas para a produção de carne (Fig. 8).

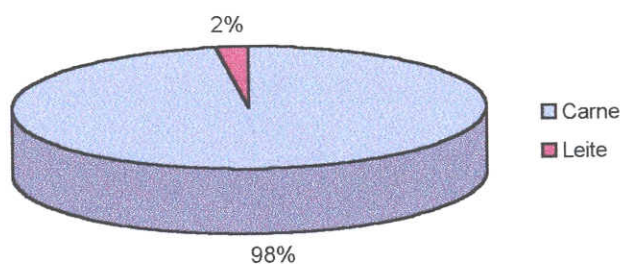


Figura 8. Tipos de explorações para bovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

A Figura 9 demonstra que 75% das propriedades rurais mantêm o ciclo completo de criação para

bovinos, devido à grande extensão das propriedades localizadas nestas regiões.

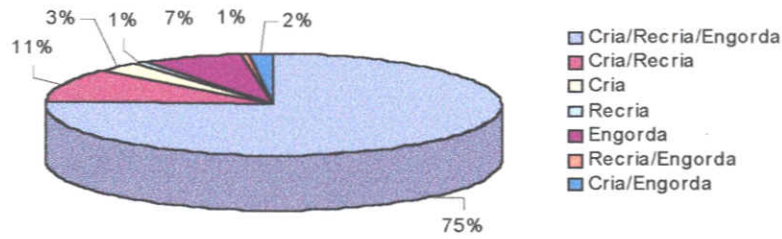


Figura 9. Tipos de criações para bovinos encontrados nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

As características raciais dos ovinos indicam que 35% das propriedades possuem animais da raça

Corriedale e 36% criam mais de uma raça em suas propriedades (Fig.10).

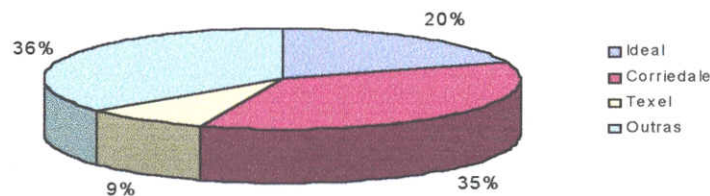


Figura 10. Características raciais dos ovinos encontrados nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

As características raciais dos bovinos indicam que 37% dos bovinos criados são animais cruzados (Fig. 11).

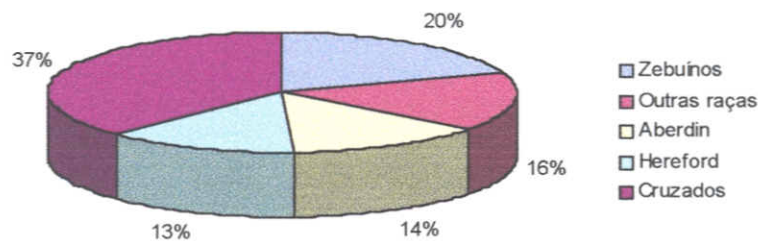


Figura 11. Características raciais dos bovinos encontradas nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999

As propriedades amostradas encontravam-se localizadas em terrenos secos, alagadiços ou mistos (áreas alagadiças e secas em uma mesma propriedade). Os terrenos alagadiços são caracterizados por áreas com alta umidade do solo e várzeas sazonalmente alagadas cobertas por grama batatais (*Paspalum notatum*) e angola

(*Brachiaria mutica*). Os secos caracterizados por áreas montanhosas e planaltos compostos de vegetação nativa (trevos diversos, azevém, aveia, ervilhaca entre outras). Analisando o gráfico verificamos que 51% das propriedades estudadas possuíam terrenos mistos (Fig. 12).

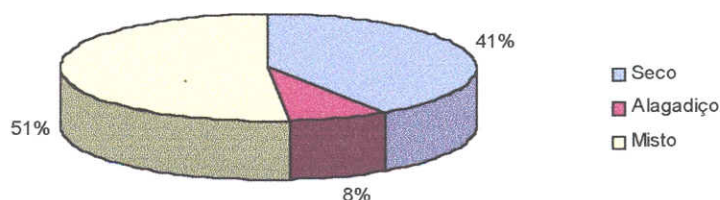


Figura 12. Tipos de terrenos encontrados nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

Dos 128 proprietários entrevistados somente 39% declararam que algum tipo de doença ocorria no rebanho ovino. Destes, 12% tinham problemas com aborto, repetição de cio e fetos mumificados concomitantemente; 11% descreveram quadros independentes de aborto ou repetição de cio e 16% relataram o quadro de "foot root" causado pela bactéria *Fusum*

*bacterium*. Nessas propriedades com "foot root", 13% eram propriedades localizadas em terrenos secos e pedregosos. Em nenhuma das propriedades amostradas foi descrito mal formação congênita de bovinos ou ovinos. Nas demais não foram citados a ocorrência de qualquer doença (Fig. 13).

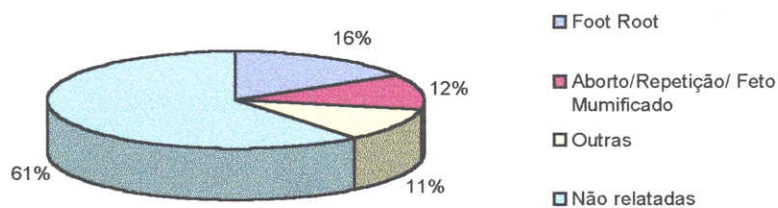


Figura 13. Doenças relatadas nos ovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

Em relação a descrição de doenças encontradas nos bovinos, 47% do total de proprietários relataram presença de problemas reprodutivos,

tais como, aborto/repetição de cio ou somente repetição de cio em suas propriedades (Fig. 14).

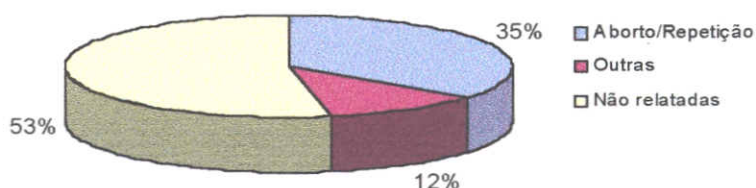


Figura 14. Doenças relatadas nos bovinos nas propriedades amostradas das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul, 1999.

#### 4.5. PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL NAS MESORREGIÕES SUDOESTE E SUDESTE DO RIO GRANDE DO SUL EM OVINOS

Do total de 1341 soros de 134 propriedades amostradas para ovinos, foi constatada somente

uma propriedade no município de São Borja com dois ovinos positivos pela prova de IDGA, significando 0,74% das propriedades com animais positivos e 0,15 % de prevalência de anticorpos para a LA (Tab. 8 e Fig. 15).

Tabela 8. Resultados de Imunodifusão em Gel de Ágar para Língua Azul em ovinos do Rio Grande do Sul, 1999.

Municípios	Propriedades amostradas	Propriedades positivas.	Nº amostras coletadas	Ovinos positivos	%* positivos
Alegrete	30	0	298	0	0
Arroio Grande	04	0	40	0	0
Bagé	11	0	110	0	0
Caçapava	05	0	49	0	0
Canguçu	04	0	40	0	0
Herval do Sul	13	0	130	0	0
Hulha Negra	01	0	10	0	0
Lavras do Sul	05	0	46	0	0
Pedro Osório	02	0	20	0	0
Pelotas	01	0	10	0	0
Piratini	05	0	50	0	0
Rio Grande	02	0	20	0	0
Santana da Boa Vista	04	0	40	0	0
Santana do Livramento	14	0	140	0	0
São Borja	05	1	50	2	4,0
São Francisco de Assis	03	0	30	0	0
São Lourenço do Sul	01	0	10	0	0
Uruguaina	24	0	238	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>135</b>	<b>1</b>	<b>1341</b>	<b>2</b>	<b>0,15</b>

\*Porcentagem no município.

#### 4.6 PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL NAS MESORREGIÕES SUDOESTE E SUDESTE DO RIO GRANDE DO SUL EM BOVINOS

Do total de 1272 soros de 128 propriedades amostradas, foi constatada uma propriedade em Santana da Boa Vista com dois bovinos positivos e uma propriedade em São Borja com seis bovinos positivos pela prova de IDGA, significando 1,56% de propriedades com animais

positivos e 0,63% de prevalência de anticorpos para LA (Tab. 9 e Fig. 15).

Os soros positivos foram testados frente ao antígeno padrão (VMRD) e obtiveram exatamente o mesmo resultado encontrado anteriormente. Esse segundo teste, foi realizado para confirmar os resultados encontrados com o antígeno produzido.

Tabela 9. Resultados de Imunodifusão em Gel de Ágar para Língua Azul em bovinos do Rio Grande do Sul, 1999.

Municípios	Propriedades amostradas	Propriedades positivas	Nº amostras coletadas	Bovinos positivos	%* positivos
Alegrete	30	0	300	0	0
Arroio Grande	04	0	39	0	0
Bagé	12	0	120	0	0
Canguçu	04	0	34	0	0
Herval do Sul	12	0	119	0	0
Hulha Negra	01	0	10	0	0
Lavras do Sul	05	0	50	0	0
Pedro Osório	02	0	20	0	0
Pelotas	01	0	10	0	0
Piratini	05	0	50	0	0
Rio Grande	02	0	20	0	0
Santana da Boa Vista	04	1	40	2	5
Santana do Livramento	14	0	140	0	0
São Borja	05	1	50	6	12
São Francisco de Assis	03	0	30	0	0
São Lourenço do Sul	01	0	10	0	0
Uruguaina	23	0	230	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>128</b>	<b>2</b>	<b>1272</b>	<b>8</b>	<b>0.63</b>

\*Porcentagem no município.

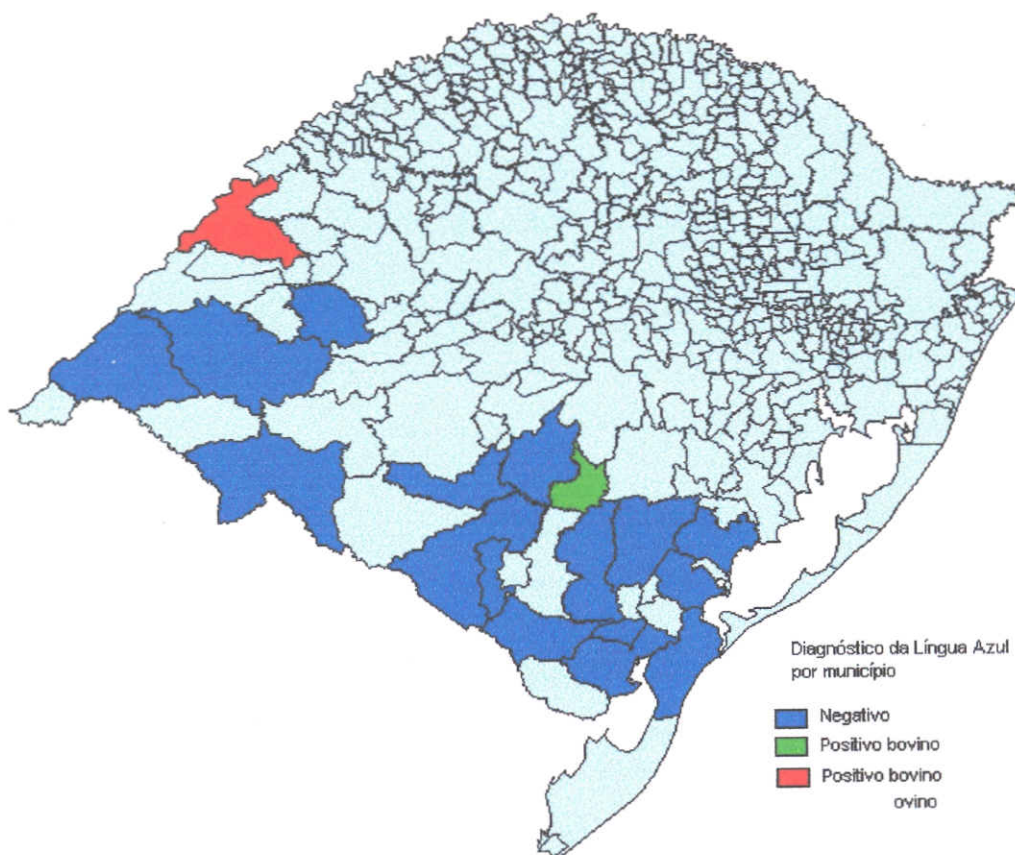


Figura 15. Municípios com animais soropositivos para Língua Azul nas mesorregiões sudoeste e sudeste do Estado do Rio Grande do Sul, 1999.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1. ANTÍGENO PRODUZIDO

As técnicas de produção de antígenos para uso na prova de IDGA geralmente se baseiam na concentração de suspensões virais brutas, após clarificação para retirada de restos celulares.

De acordo com Arita et al. (1993), para obtenção de melhor qualidade do antígeno produzido é indicada a ultra-centrifugação. Porém os resultados obtidos neste trabalho, através do IDGA, sugerem que o processo da ultra-centrifugação após a concentração do antígeno não é necessário, uma vez que ela pode aumentar o custo e o tempo final da produção do antígeno, apresentando resultados iguais.

O antígeno produzido e os antígenos padrões utilizados demonstraram semelhanças nos padrões das bandas na eletroforese. Uma banda bem evidente próxima do PM de 60 kDa está presente nos antígenos produzido e CPFA e fraca no antígeno VRMD. A presença desta banda é compatível com NS<sub>1</sub> (PM64) que é uma proteína conservada entre os diferentes sorotipos do VLA.

A possibilidade de NS<sub>1</sub> ser a proteína evidenciada no SDS-PAGE realizado com o antígeno concentrado 40 vezes está fundamentada no trabalho de Arita et al. (1993). Nesse trabalho foi demonstrado que somente uma banda de proteína com peso molecular próximo de NS<sub>1</sub> (64 kDa) foi obtida quando a banda de precipitação foi recortada da agarose e estudada por eletroforese. Essa proteína seria responsável pela linha de precipitação no teste de IDGA.

Huisman & Els (1979), Mehan et al. (1986) e Roy (1996), já relatavam a importância de NS<sub>1</sub> como sendo uma das prováveis proteínas mais importantes para a reação antigênica no teste IDGA. NS<sub>1</sub> está relacionada com o aparecimento dos túbulos que estão presentes em grande número, predominantemente, em volta ou próximo do núcleo, ligados a filamentos componentes do citoesqueleto da célula e presume-se que estão envolvidos nos processos de replicação e transporte viral. Estas estruturas são compostas apenas de NS<sub>1</sub>, proteína expressa em maior quantidade que qualquer outra durante a replicação do VLA (Eaton et al., 1988). Porém

não podemos afirmar que a banda semelhante encontrada entre os antígenos seja NS<sub>1</sub>, uma vez que, bandas semelhantes às evidenciadas nos antígenos, foram também visualizadas na suspensão celular.

Gorman (1992), descreveu o gene que codifica a proteína NS<sub>1</sub> para o VLA sorotipo 10 e para EHDV-2: possui tamanho idêntico, 60% de similaridade na seqüência de nucleotídeos e 50% de similaridade na seqüência de aminoácidos. Apesar de algumas outras proteínas como VP<sub>7</sub> e VP<sub>3</sub> mostrarem semelhanças na seqüência de aminoácidos, parece que as reações cruzadas que podem ocorrer entre estes dois vírus na IDGA podem ser devido a NS<sub>1</sub>.

No processo de concentração da suspensão viral por filtração tangencial, proteínas de baixo peso molecular foram desprezadas, permanecendo somente aquelas de maior peso molecular. Nesse processo de ultra-filtração, 98% das proteínas com pesos moleculares iguais ou superiores a 17 kDa foram retidas pela membrana e conseqüentemente estão presentes no concentrado obtido.

### 5.2. REATIVIDADE X ESTABILIDADE DO ANTÍGENO PRODUZIDO

Os antígenos tratados com PMSF mostraram ser mais reativos e estáveis as diferentes temperaturas de armazenagem em relação ao antígeno sem PMSF, um mês e dois meses após a sua produção. Ainda, podemos concluir que a melhor temperatura de armazenagem do antígeno durante o período testado foi de -70°C, onde as linhas de precipitação formadas entre os antígenos e anticorpos foram mais claras (fortes).

A manutenção da qualidade do antígeno tratado com PMSF é provavelmente devido à sua ação de ligação aos sítios ativos das serino-proteinases presentes nas organelas celulares, impedindo que elas degradem polipeptídeos presentes no meio (Reis & Leite, 1994). O antígeno tratado com PMSF, permaneceu livre destas enzimas, tornando sua atividade antigênica mais eficaz, com linhas de precipitação mais fortes.

O antígeno bruto com PMSF permaneceu estável com linhas de precipitação claras e fortes no período testado (dois meses). O tempo utilizado para testar a estabilidade do antígeno produzido

foi pequeno e por isto sugerimos que o teste de estabilidade seja realizado por um período maior que o estudado.

### 5.3. PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

Até o momento, no Brasil, anticorpos contra a LA em ovinos somente haviam sido descritos por Cunha et al. (1988) no Rio de Janeiro e Arita et al. (1992) em São Paulo, os quais, observaram prevalência de 24,2% e 52,7% de soropositivos em um total de 33 e 72 animais testados, respectivamente.

Cunha et al. (1987), já mencionavam a importância de um estudo mais detalhado sobre a importância econômica desta doença no Rio Grande do Sul, uma vez que a ovinocultura tem grande importância econômica para o Estado e por ser este, o maior criatório de ovelhas do país.

Neste trabalho foram estudadas 1341 amostras coletadas de ovinos acima de um ano de idade, e observou-se 0,74% de propriedades com ovinos positivos correspondendo a 0,15% de animais soropositivos. Este resultado indica uma baixa prevalência da doença nesta espécie no Rio Grande do Sul, uma vez que as regiões amostradas (Sudoeste e Sudeste Rio-Grandense), compreendem os maiores criatórios de ovinos, com um efetivo de 3.800.000 animais, significando 75% do rebanho total do estado e 37% do total existente no Brasil (IBGE, 1996). A baixa prevalência encontrada nesta região, pode ser diferente para as regiões localizadas ao Norte e Nordeste do Estado, onde as condições epidemiológicas (temperatura e umidade) podem favorecer a multiplicação e atividade dos vetores. Contudo, a alta prevalência de terrenos mistos e alagadiços nas propriedades estudadas, associada a temperatura ideal (13°C a 35°C), podem facilitar a multiplicação dos vetores, e ocorrência e transmissão da LA, como descreve Sellers, (1981). No Rio Grande do Sul o verão é caracterizado por temperaturas médias que oscilam entre 20°C e 40°C, e no inverno média de 10°C a 15°C (IBGE, 1993).

No presente estudo, observou-se que ovinos e bovinos foram positivos em uma mesma propriedade que se localizava no município de São Borja. Destes, dois ovinos e seis bovinos foram soropositivos. Nesta propriedade os

animais conviviam harmonicamente e sobre o mesmo manejo não diferindo das demais propriedades estudadas. Esses resultados poderiam indicar a existência de espécies de *Culicoides* com preferência alimentar pelos bovinos em relação aos ovinos na área estudada, como relatados por Gibbs e Greinner, (1988).

### 5.4 PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

Apesar dos vários trabalhos mostrarem sorologia positiva para bovinos em várias partes do Brasil (Lobato, 1999) apenas o relatado por Cunha (1987) trata do estudo da LA em bovinos no Rio Grande do Sul. Os autores pesquisaram anticorpos anti-LA em 409 bovinos adultos, procedentes de criações leiteiras de 13 municípios localizados nas mesorregiões Centro-ocidental e Noroeste Rio-Grandense e encontraram prevalência de 1,22%, através da prova de IDGA.

Neste trabalho, das 1272 amostras de soros bovinos testadas, seis bovinos oriundos de São Borja e dois bovinos de Santana da Boa Vista foram soropositivos para LA, significando 1,56% das propriedades com animais positivos e estabelecendo uma prevalência de anticorpos precipitantes de 0,63%, diferindo da prevalência de 1,22% encontrada por Cunha et al., (1987). Esta divergência entre os resultados se dá provavelmente pelas diferentes condições ambientais que apresentam as mesorregiões estudadas neste trabalho e por Cunha et al. (1987). Diferenças ambientais nos municípios das regiões mais ao norte do estado poderiam favorecer a multiplicação dos vetores e conseqüentemente, a transmissão.

O município de São Borja encontra-se na latitude (S) 28,67683° e longitude (WG) 55,96910° com uma altitude de aproximadamente 500 m, ou seja, é o município com maior longitude em relação aos demais municípios amostrados. Já o município de Santana da Boa Vista, apresenta uma latitude de (S) 30,89591 e longitude (WG) 53,15308.

Sellers (1981), indicava que o limite de latitude sul para presença do VLA era incerta para a América do Sul. Parsonson (1992), descreve que este limite estaria entre 40°N e 35°S. Segundo o Código Zoonosológico Internacional (1999),

Capítulo 2.1.9, Artigo 2.1.9.2 item 1, considera-se um país livre da LA quando a sua totalidade está localizada na zona situada fora dos limites de 40°N e 35°S e que não estejam adjacentes a um país que não está livre de LA.

Com os dados obtidos neste trabalho podemos sugerir a presença do VLA para a latitude sul de 28.67°, estabelecendo novos limites para a presença do mesmo.

Cunha et al. (1988) e Ward (1996), discutem que animais estabulados ou em criações intensivas são mais susceptíveis aos vetores, talvez pela alta concentração de animais por área e ou pelas características das propriedades, tais como: umidade elevada e presença de água parada favorecendo assim a presença e multiplicação do mosquito.

O tipo de criação predominante encontrado neste estudo para bovinos e ovinos foi de propriedades com grandes extensões de terras, onde os animais eram mantidos nos campos na maior parte do tempo, caracterizando o sistema de criação extensiva. A propriedade onde se encontrou bovinos e ovinos com soros positivos, no município de São Borja, tinha como principal atividade a produção leiteira e os animais eram criados em sistema semi-intensivo. Talvez essa análise possa indicar que animais criados confinados ou em menores áreas possam estar mais susceptíveis aos vetores que aqueles criados extensivamente, uma vez que os resultados encontrados por Cunha et al. (1987) também foram obtidos em rebanhos leiteiros.

Pelas entrevistas realizadas parece que a LA não representa uma doença que causa prejuízos diretos nos rebanhos estudados. Alguns sintomas clínicos descritos pelos proprietários como aborto e repetição de cio podem ser compatíveis com a doença. Porém quando associou-se a baixa prevalência de anticorpos encontrada, concluiu-se que essas doenças descritas são provavelmente relacionadas a outras ligadas ao diagnóstico diferencial da LA. Entretanto, não deve-se descartar a possibilidade de que ocasionalmente quadros clínicos da LA possam ocorrer e ser confundidos com outras doenças ou mesmo passarem despercebidos.

É importante ainda ressaltar, os prejuízos que a LA pode trazer com as regras de restrição de mercado. O Rio Grande do Sul integra um grupo

de grande relevância no que tange a formação político-econômica do Mercosul. De acordo com a Resolução N°66/94 do Ministério da Agricultura que estabelece normas sanitárias para importação e exportação de animais ovinos entre os estados que fazem parte do Mercosul exige-se que: Capítulo II – Artigo 8 “O Serviço de Saúde do país de origem deve certificar que não ocorreu Estomatite Vesicular e Língua Azul durante os últimos trezentos e sessenta e cinco dias anteriores ao despacho dos animais, no estabelecimento de origem e/ou procedência e durante os últimos noventa dias nos localizados num raio de 25 Km”; Capítulo IV – Artigo 10 “Os animais motivo de exportação, serão mantidos em isolamento durante 30 dias prévios ao embarque em instalações aprovadas, segundo Norma Vigente MERCOSUL e sob supervisão oficial. Deverão ser submetidos, de acordo com a sua categoria (destino final), às seguintes provas sanitárias em laboratório oficial ou habilitado, com resultado negativo, a fim de que seja expedido o certificado sanitário correspondente: item 2 – Língua Azul (A- Prova de ELISA-B ou B- Imunodifusão em Gel de Ágar)”.

O problema de importação de animais deve ser considerado, pois os resultados obtidos neste trabalho mostram que a área estudada apresenta um grande número de animais susceptíveis. Sabe-se que a probabilidade de introdução da doença pela importação de ovinos e bovinos vivos é muito maior que a introdução de sêmen ou embriões. Embora a transmissão venérea através de sêmen contaminado e transmissão congênita do VLA possam ocorrer na população de ruminantes, a restrição geográfica da doença indica que estes mecanismos não são importantes para a perpetuação da doença a longo prazo (Lobato, 1999).

Apesar da baixa prevalência encontrada, os resultados indicam que o vírus está circulando no ambiente. Por isto, é importante lembrar que mudanças climáticas em regiões limítrofes das áreas endêmicas, movimentos de animais, mudança nas características da estação chuvosa e principalmente movimento dos ventos podem trazer os vetores *Culicoides* das regiões distantes para áreas com grande número de animais susceptíveis, podendo provocar mudanças na prevalência e ocorrência clínica da LA.

A identificação dos sorotipos presentes no sudoeste e sudeste Rio Grandense seria de extrema importância não só para fins de exportação e maior segurança na importação de animais mas também no caso de elaboração de vacinas, caso surtos da doença venham a ocorrer. O vírus nunca foi isolado no Brasil e a informação que temos sobre os sorotipos presentes, é baseada na vírus neutralização realizada em laboratórios de referência fora do país. Os resultados destes testes mostraram que os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 17, 19 e 20 foram encontrados para bovinos, 4, 6, 11, 12, 13, 14 e 17 para caprinos e 4 para ovinos (Silva, 1978 e Cunha, 1990). Campbell e Groocock (1980), confirmaram os sorotipos 4 e 20 para bovinos, sendo o sorotipo 4 isolado de um bovino exportado do Brasil para os EUA. É importante salientar que o sorotipo 4 do VLA é exótico para os EUA.

Como o Brasil, outros países localizados em regiões tropicais e temperadas apresentam um grande número de animais soropositivos para LA sem registrar prejuízos com ocorrência clínica da doença. Este fato vem sendo discutido e estudado por pesquisadores que suspeitam que isto pode ser devido à diferença de patogenicidade entre os sorotipos existentes e/ou diferença de sensibilidade entre raças podendo existir algumas que sejam mais resistentes à infecção ou manifestação dos sinais clínicos.

Trabalhos realizados por Berry et al. (1982) e Stott et al. (1985), descreveram que algumas raças de ovinos destinadas a produção de lã e as raças Warhill e Suffolk apresentavam diferentes respostas imunes ao VLA. Baseados nestes dados procuramos saber através do inquérito de opinião as raças de ovinos e bovinos mais freqüentes. Em ovinos observamos maior freqüência das raças Ideal, Corriedale e Texel (64%) e em bovinos os Zebuínos, os cruzados e raça Hereford correspondiam a 70%, caracterizando para ambas as espécies, raças com aptidão para carne. Nas propriedades onde encontramos animais positivos predominavam respectivamente as raças Holandesas e Zebuínas para bovinos; Ideal e Corriedale para ovinos e aparentemente não havia sintomatologia clínica da doença. Porém devido a baixa prevalência da doença na região estudada nenhuma associação entre a raça, soropositividade e doença clínica pode ser analisada.

O teste IDGA é muito empregado na vigilância sanitária e em levantamentos epidemiológicos (Della-Porta et al., 1985 e Littlejohns et al., 1988). É o teste recomendado pelos órgãos oficiais (Resolução 66/94) e O.I.E.(1999) e além de ser um teste de baixo custo e de fácil execução. Suas desvantagens estão relacionadas com a falta de especificidade, quantificação, a não qualificação dos sorotipos envolvidos, podendo ainda existir reações cruzadas com outros Orbivirus (Afshar, 1994).

A necessidade do cumprimento das regras de importação e exportação de animais vivos e a efetivação de programas rígidos voltados para a vigilância sanitária da LA devem ser enfatizados pelo governo federal.

O conhecimento da situação da doença nos ovinos das regiões localizadas ao norte do estado do Rio Grande do Sul são fundamentais para o trânsito entre os países constituintes do Mercosul.

## 6 CONCLUSÕES

- O antígeno produzido é satisfatório para utilização nos testes para diagnóstico da Língua Azul pela prova de IDGA.
- Condições ideais para armazenagem do antígeno produzido foram com PMSF a -70°C.
- A porcentagem de propriedades na região estudada com animais positivos foi de 0,74% para ovinos e 1,56% para bovinos, de acordo com a unidade amostral estabelecida.
- Os resultados obtidos nesse estudo sugerem uma baixa prevalência da LA para as regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul com prevalência de 0,63% para bovinos e 0,15% para ovinos.
- Anticorpos anti Orbivirus estão presentes na latitude sul de S°28,67683 e longitude de WG°55,96910.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V.L.V. *Prevalência de bovinos regentes à prova de imunodifusão para língua azul na Região Norte do Brasil*. Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1982. 45p. Dissertação (Mestrado).
- ABREU, V.L.V., GOUVEIA, A.M.G., MAGALHÃES, H.H. et al. Prevalência de anticorpos para língua azul (bluetongue) em caprinos do Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, 1984, Belém. *Anais...* Belém: 1984. p.178.
- AFSHAR, A. Bluetongue: laboratory disease. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.17, n.3/4, p.221-242, 1994.
- ARITA, G.M., GATTI, M.S., DEAK, J.G. et al. Bluetongue virus: production and study of viral antigen for serological diagnosis. *J. Virol. Methods*, v.44, n.2/3, p.281-286, 1993.
- ARITA, G.M., GATTI, M.S.V., GERMANO, P.M.L. et al. Comparison of indirect immunofluorescence with agar gel immunodiffusion for the diagnosis of bluetongue virus infection. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.25, p.503-508, 1992.
- BERRY, L.J., OSBURN, B.I. et al. Inactivated bluetongue virus vaccine in lambs: differential serological responses related to breed. *Vet. Res. Comm.*, n.5, p.289-293, 1982.
- BLUETONGUE ANTIBODY TEST KIT. Veterinary medical research and development. Pullman, WA, USA.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Secretária de defesa sanitária animal. Comunicação ao Office International des Epizooties. Ofício nº 0136-10, Brasília, 05/06/1978.
- BROWN, C.C., OLANDER, H.J., CASTRO, A.E. et al. Prevalence of antibodies in goats in North-eastern Brazil to selected viral and bacterial agents. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.21, n.3, p.167-169, 1989.
- CAMPBELL, C.H., GROOCOCK, C.M., J.A. Detection of bluetongue virus and antibodies in animals for importation into the United States. *Arbovirus Research in Australia*, p.75-81, 1982.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSSES. *Bioestadística*. Procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud, n.18, p.35, 1979.
- CASTRO, R.S., LEITE, R.C., ABREU, J.J. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.24, n.3, p.173-176, 1992.
- CUNHA, R.G., SOUZA, D.M., TEIXEIRA, A.C. Anticorpos precipitantes para o vírus da língua azul em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Biológico*, v.48, p.99-103, 1982.
- CUNHA, R.G., SOUZA, D.M., PASSOS, W.S. Anticorpos para o vírus da língua azul em soros de bovinos dos Estados de São Paulo e da Região Sul do Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.6, n.9, p.121-124, 1987.
- CUNHA, R.G., SOUZA, D.M., TEIXEIRA, A.C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Flum. Med. Vet.*, v.3, n.2, p.53-56, 1988.
- CUNHA, R.G. Anticorpos neutralizantes em soros de ruminantes domésticos do Brasil frente aos diferentes sorotipos do vírus da língua azul. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.12, p.3-7, 1990.
- DELLA-PORTA, A.J., SELLERS, R.F., HERNIMAN, K.A.J. et al. Serological studies of Australian and Papua New Guinean cattle and Australian sheep for the presence of antibodies against bluetongue group viruses. *Vet. Microbiol.*, v.8, p.147-162, 1983.
- DELLA-PORTA, A.J., PARSONSON, I.M., McPHEE, D.A. Problems in the

- interpretation of diagnostic tests due to cross-reactions between orbiviruses and broad serological responses in animals. In: *Bluetongue and related orbiviruses*. New York: Alan R. Liss, Inc. 1985. p.445-453.
- EATON, B.H., HYATT, A.D., WHITE, J.R. Localization of the nonstructural protein NS<sub>1</sub> in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology*, v.63, p.527-537, 1988.
- FORATTINI, O.P. Culicoides da região neotropical. *Arq. Fac. Hig. e Saúde Publ. da USP*, v.11, p.162-526, 1957.
- GARD, G.P., KIRKLAND, P.D. Bluetongue – Virology and serology. In: *Australian standard diagnostic techniques for animal diseases*. Melbourne: CSIRO publications, 1993. p.8-9.
- GARD, G.P., SHORTHOSE, J.E., WEIR, R.P. et al. Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation methods. *Vet. Microbiol.*, v.18, p.109-118, 1988.
- GIBBS, E.P.J., GREINNER, E.C. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. In: *The arbovirus Epidemiology and ecology*. Flórida: T.P. Mpnath Ed, CRC Press Inc, 1988. p.39-70. v.3.
- GORMAN, B.M. An overview of the arbovirus. In: WALTON, T.E., OSBURN, B.I. *Bluetongue, African horse sickness and Related orbivirus*. Boca Raton: CRC Press, 1992, p.335-346.
- HUISMANS, H., ELS, H.J. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*, v.92, p.397-406, 1979.
- HOURRIGAN, J.L., KLINGSPORN, A.L. Epizootiology of bluetongue. The situation in the United States of America. *Aus. Vet. J.*, v.51, p.203-208, 1975.
- IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática principal. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Brasília, 1996.
- IBGE. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, v.53, p. 1-1/ 8-30, 1993.
- JOCHIM, M.M., CHOW, T.L. Immunodiffusion of bluetongue. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, p.33-41, 1969.
- LAGE, A.P., CASTRO, R.S., MELO, M.T.V. et al. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Revue. Élev. Méd. Vét. Pays. Trop.*, v.49, n.3, p.195-197, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970.
- LITTLEJOHNS, I.R., BURTON, R.W. The occurrence of antibody to bluetongue virus in New South Wales. II. Coastal region and age distribution surveys. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.41, p.571-578, 1988.
- LITTLEJOHNS, I.R., BURTON, R.W., SHARP, J.M. Bluetongue virus in New South Wales: isolations from, and serological tests on samples from sentinel cattle. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.41, p.579-587, 1988.
- LOBATO, Z.I.P. *Vírus de língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccínia e resposta imune*. Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996. 200p. Tese (Doutorado).
- LOBATO, Z.I.P. Língua azul: a doença nos bovinos. *Revista Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.4, p.515-523, 1999.
- MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines. 2<sup>nd</sup> ed. Paris: *Office International des Epizooties*, 1992. 783p.

- MARTYN, J.C., GOULD, A.R., EATON, B.T.  
High level expression of the major core protein VP7 and non structural protein NS3 of BTV in yeast: use of expressed VP7 as diagnostic group reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res.*, v.18, p.165-169, 1990.
- MECHAN, J.O., DEAN, V.C., JOCHIM, M.M.  
Correlation of serotype specificity and protein structure of the five U.S. serotypes of bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, v.67, p.2617-2624, 1986.
- MELO, C.B., OLIVEIRA, A.M., CASTRO, R.S. et al.  
Anticorpos precipitantes contra o vírus da língua azul em bovinos de Sergipe. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.2, n.2, p.125-127, 1999.
- MELO, C.B., OLIVEIRA, A.M., AZEVEDO, E.O. et al.  
Anticorpos para o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.52, n.1, 2000.
- MOREIRA, E.C., SILVA, J.A., VIANA, F.C. et al.  
Teste de imunodifusão para língua azul em bovinos de alguns municípios do Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 9, 1980, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: NAPq-EV-UFMG, 1980, p.83.
- NORMAS SANITÁRIAS PARA A IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS OVINOS ENTRE OS ESTADOS PARTE DO MERCOSUL. *Resolução N°66/94*, Ministério da Agricultura - PVA, Santana do Livramento.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Código Zoosanitário Internacional*, 1999, Cap.2.1.9.
- PEARSON, J.E., JOCHIM, M.M.  
Protocol of the immunodiffusion test for bluetongue. 22.ed. *American Association Veterinary Diagnosticians*, 1979, p.463-471: Annual Proceedings.
- PEARSON, J.E., GUSTAFSON, G.A., SHAFER, A.L. et al.  
Diagnosis of bluetongue and hemorrhagic disease. In: WALTON, T.E., OSBURN, B.I. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: proceedings of the second international symposium*, 1991, Paris. CRC Press, Boca Raton, France: 1992, p.533-546.
- PARSONSON, I.M.  
*Overview of bluetongue infection of sheep*. In: WALTON, T.E., OSBURN, B.I. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus*. Boca Raton: CRC Press, 1992, p.444-451.
- RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C., GAY, C.C.  
*Veterinary Medicine; a textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 8ed. London: Bailliere Tindall, 1994, p.1763.
- REED, L.J., MUENCH, H.  
A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, n.3, p.493-497, 1938.
- REIS, J.K.P., LEITE, R.C.  
Otimização da produção e estabilização do antígeno do vírus da anemia infecciosa equina, para uso diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.46, n.4, p.380-385, 1994.
- ROY, Polly.  
Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Res.*, v.13, p.179-206, 1989.
- ROY, Polly.  
Orbiviruses and replication. In: FIELDS, D.M., KNIPE, P.M., HOWLEY et al. *Fields virology*. 3ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996, v.2, cap.56, p.1709-1733.
- SILVA, J.A., MODENA, C.M., MOREIRA, E.C. et al.  
Frequência de febre aftosa, língua azul, leucose enzoótica bovina em caprinos de diferentes sistemas de produção no Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.40, n.6, p.393-403, 1988.

- SILVA, F.J.F. *Relatório sobre estudos de ocorrência de língua azul em São Paulo*. Brasília: (Trabalho não publicado). Relatório da comissão de estudos – Ministério da Agricultura. Port. Min. nº 150, fevereiro, 1978.
- SELLERS, R.F. Bluetongue and related diseases. In: Gibbs, E.P.J. ed. *Virus diseases of food animals: a world geograpy of epidemiology and control*. London: Acad. Press Inc., 1981. v.2. cap.23, p.567-583.
- STOTT, L.J., BARBER, T.L., OSBURN, B.I. Immunologic response of sheep to inactivad and virulent bluetongue virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.5, p.1043-1049, 1985.
- WARD, M.P. Climatic factors associated whit the infection of herds of cattle with bluetongue viruses. *Vet. Res. Comm.*, v.20, p.273-283, 1996.
- WARD, M.P., GARDNER, I.A., FLANAGAN, M. Evaluation of agar gel immunodiffusion test to detect infection of cattle with bluetongue viruses in Queensland, *Australia*. *Vet. Microbiol.*, v.45, p.27-34, 1995.
- WIRTH, W.W. A catalogue of the diptera of the americas south of the united states. *Museu de Zoologia da USP*, 1974. 89p.

## ANEXO I

### INQUÉRITO DE OPINIÃO

1) Identificação do proprietário:

Nome: \_\_\_\_\_  
Estabelecimento: \_\_\_\_\_  
Município: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

---

2) Qual a principal atividade: ( ) Pecuária ( ) Agrícola ( ) Mista

3) Rebanho:

Ovino: ( ) Carne ( ) Lã ( ) Misto  
Bovino de corte: ( ) Cria ( ) Recria ( ) Engorda  
Bovino de Leite: ( ) A ( ) B ( ) C

4) Características raciais:

Ovinos: ( ) Merino ( ) Ideal ( ) Texel ( ) Corriedale  
( ) Ile de France ( ) Suffolk ( ) Outras

Bovinos: ( ) Charolês ( ) Zebuínos ( ) Aberdin angus ( ) Hereford ( ) Outras

5) Tipo de solo: ( ) Alagadiço ( ) Seco ( ) Misto

6) Tem observado surtos de doenças no rebanho? Quais? Bovino ou Ovinos?

Abortamento ( )  
Repetição de cio ( )  
Pododermite ( )  
Fetos mumificados ( )  
Foot Root ( )  
Outras ( )