

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM ESPÉCIES
DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES SUSCEPTÍVEIS E NÃO
VACINADAS, NO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL.**



Rita de Cássia da Silva Paes

JABOTICABAL/SP

2001

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM ESPÉCIES DE
ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES SUSCEPTÍVEIS E NÃO VACINADAS, NO
PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hélio José Montassier

ORIENTADA: Rita de Cássia da Silva Paes

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de
Jaboticabal-UNESP, para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Veterinária na Área de
Concentração em Patologia Animal.

JABOTICABAL/SP

2001

Paes, Rita de Cássia da Silva
P126p Pesquisa de anticorpos anti-vírus da febre aftosa em
espécies de animais domésticos e silvestres susceptíveis e não
vacinadas, no Pantanal de Mato Grosso do Sul / Rita de Cássia
da Silva Paes. --Jaboticabal, 2001
xv, 71p. : il. ; 28cm

Dissertação (Mestre) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001

Orientador: Hélio José Montassier

Banca examinadora: Aramis Augusto Pinto, José Antonio
Jerez

Bibliografia

1. Febre aftosa. 2. Animais domésticos/silvestres. 3.
Pantanal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988.4:636.2/.4

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

e-mail: sanimal@sgi.ms.gov.br

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RITA DE CÁSSIA DA SILVA PAES, nascida em 10 de outubro de 1960, em Campos/RJ, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, em dezembro de 1985.

Foi funcionária da Secretaria de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul no período de 1988 a 1995 como responsável pelo Centro de Reabilitação de Animais Silvestres, em Campo Grande/MS. Em 1995, prestou Concurso Público para o Departamento de Inspeção e Defesa Sanitária – IAGRO/MS, vinculado a Secretaria de Agricultura e Abastecimento, sendo aprovada e contratada para desenvolver as atividades no Escritório Local de Corumbá/MS. Foi transferida para o Laboratório de Doença Animal – IAGRO em Campo Grande/MS em 1999 onde permanece até a atual data.

DEDICATÓRIA

Este trabalho, na verdade, foi escrito à seis mãos. Quatro delas, são mãos pequeninas, ainda, mas com poderes de transformação.

É bem verdade, que estas mãozinhas já foram menores. Cabiam na palma da minha, mas, elas cresceram e hoje, são as minhas que se apoiam nelas.

Quando as minhas mãos se sentiam vazias e cansadas, iam procurar sustento e conforto nas quatro mãozinhas, que se entrelaçavam as minhas, num momento de carinho e amor.

E estas mãozinhas sábias me consolaram num momento difícil. Me sustentaram de pé muitas vezes. Me deram luz.

Por tudo isso e muito, muito mais, dedico este trabalho aos meus filhos, ou melhor, aos meus "Anjos da Guarda", Bruna e Gabriel, com toda a minha paaaiiixããã de mãe e admiradora.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos, Bruna e Gabriel, pela compreensão, colaboração e pela força que sempre me deram. Vocês são muito mais do que eu mereço. Muito amor para os dois, sempre.

Aos meus pais, por tantos exemplos de vida os quais direcionaram meu caminho muitas vezes, por tanto amor que sempre me dedicaram e pelas orações. Agradeço a Deus por ter me concedido a benção de tê-los ao meu lado.

Aos meus irmãos, cunhados (as), sobrinhos (as) por transporem a distância voando nas asas da lembrança e me saudarem todos os dias com seus sorrisos, palavras e momentos juntos, amenizando a saudade que sinto. Valeu a força, mesmo de longe.

Ao Sr. Heitor e Sra. Emelita Herrera, Celina, Luis Henrique, Aninha, Rodrigo, Ariela, Esteves e toda a galerinha, por estarem presentes na minha vida e me fazendo muito feliz. Amo vocês.

Ao Heitor, por me estimular a fazer o Mestrado, por me ensinar tantas coisas da vida e pela ajuda valiosíssima na captura dos animais deste trabalho. Agradeço também as fotos cedidas.

Aos pecuaristas do Pantanal da Nhecolândia que permitiram o desenvolvimento deste trabalho em suas propriedades.

Ao Dr. Helio José Montassier, que mesmo sem me conhecer, aceitou me orientar, me proporcionando muitos conhecimentos e oportunidades de melhoria profissional. Minha gratidão será eterna.

Ao Dr. Aramis Augusto Pinto, Professor da UNESP/Jaboticabal por compartilhar sua experiência comigo, pelas discussões enriquecedoras e pela ajuda no término deste trabalho.

Aos ex-Diretores do IAGRO por autorizarem a realização deste Mestrado incentivando a capacitação dos seus técnicos.

Ao Dr. Adenan Kadri, ex-Diretor Regional de Aquidauana – IAGRO/MS, por ter me incentivado desde o primeiro momento em que pensei em fazer Mestrado e pela atenção durante dois anos que estive afastada nunca me deixando sentir “fora” da Instituição.

A atual diretoria do IAGRO, principalmente na figura do Diretor Geral, Dr. Loacir da Silva, pelo apoio recebido.

Ao ex-Diretor do Laboratório de Doença Animal - IAGRO/MS, Dr. Ademar Etiro Mori e ao atual Diretor, Dr. Otto Feldens, pela compreensão e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Doença Animal – IAGRO/MS por me receberam tão bem e pela amizade que desenvolvemos.

Ao Dr. Geraldo de Moraes, pelo incentivo. Sua calma de mineiro e sua competência profissional muito me orientam em determinados momentos da minha vida.

A minha sobrinha Melissa, Seu Onédio (em memória), Carlinhos, Nivaldo, Satiro, Silvio, Seu Porfírio, Seu Natálio, Ramão, Ramãozinho, Chami, Divino, Didi, Sebastião, Etevaldo (“Pouca telha”), Zico, Benes, Hermógenes, Nêgo, Marquinho, Jeferson, Julinho, Eliano, Seu Severiano, Paíto, Joaquim, Paulino, Ditinho, Candinho, Melquíades e Birigui. Graaaaannnde Comitiva pantaneira! Valeu o companheirismo, o estímulo nas horas mais quentes do dia e as guampadas de tereré.

A “Santa” Lurdinha, Técnica do Laboratório de Virologia - UNESP/Jaboticabal por estar sempre ao meu lado me ajudando na confecção dos testes de ELISA e nas contas matemáticas.

Ao Áureo, Taís e Viviane, técnico e estagiárias do Laboratório de Virologia-UNESP/Jaboticabal.

Ao João Araújo, o “Cebola”, pelas explicações que recebi que me elucidaram tantas dúvidas e por ter facilitado este trabalho com a sua Dissertação de Mestrado.

Aos amigos de mestrado e de laboratório, Rodrigo, Alexandre, Fátima, Ricardo e Roberta.

A minha amiga Tânia, por me dar o privilégio da sua amizade, pelo exemplo de tenacidade, pelas boas risadas que demos, e pelos longos papos no telefone. Tenho muito a agradecer.

Ao Dr. Maurício Barbanti, Professor do Departamento de Genética - UNESP/Jaboticabal, por ter cedido as amostras sanguíneas dos cervídeos e pelo incentivo ao meu trabalho.

Ao Professor Gervásio Henrique Bechara, Professor do Departamento de Patologia - UNESP/Jaboticabal pela ajuda prestada.

A Professora Rosangela Zacarias Machado, Professora do Departamento de Patologia - UNESP/Jaboticabal, pela amizade que desenvolvemos, pela paz que me proporcionava sempre que entrava em sua sala, pelas palavras de carinho e pelos conselhos em momentos ruins que atravesssei.

Aos amigos de classe, Gláucia, Lucas e Fabiana pelas boas lembranças que deixaram.

Aos profissionais do Instituto Biológico de São Paulo – Laboratório de Viroses de Bovídeos, pela ajuda na realização do teste de IDGA.

Ao Deocleciano Guerrero Gonçalves e Luciene de Oliveira Marins, Analistas de Sistema - IAGRO/MS, pelos valiosos ensinamentos no campo da informática, sempre me salvando dos “apuros cibernéticos” e envio dos e-mails.

Ao ex-Coordenador do Curso de Pós-Graduação, Dr. Angelo Berchieri Junior, UNESP/Jaboticabal.

Ao atual Coordenador do Curso de Pós-Graduação, Dr. Samir Issa Samara, UNESP/Jaboticabal.

Ao Secretariado do Curso de Pós-Graduação, UNESP/Jaboticabal, pelo bom atendimento que sempre tive.

A Bibliotecária Tiêko Takamyia Sugahara, UNESP/Jaboticabal, pela revisão da Bibliografia.

A todos os meus amigos de todas as cidades em que já morei. Esta amizade que recebo de vocês é muito do bom que tenho dentro de mim.

INDICE

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xiii
Resumo.....	xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVO.....	15
3 – MATERIAIS E MÉTODO.....	16
3.1 – Descrição do local.....	16
3.2 – Animais analisados.....	19
3.3 – Prova de IDGA para pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA.....	22
3.4 – Imunoreagentes do teste BFL-ELISA.....	22
3.4.1 – Antígenos virais.....	22
3.4.2 – Purificação dos antígenos 146S.....	23
3.4.3 – Soros de Captura anti-VFA monoespecíficos.....	24
3.4.4 – Soros Detectores anti-VFA monoespecíficos.....	24
3.4.5 – Conjugado Imunoenzimático.....	25
3.4.6 – Técnica de BFL-ELISA.....	26
4 – RESULTADOS.....	29
4.1 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA e contra as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial no teste BFL-ELISA.....	29
4.2 – Resultados da análise das amostras positivas, segundo prova de IDGA e o BFL-ELISA de acordo com a espécie animal.....	31

4.2.1 – Boi baguá.....	31
4.2.2 – Búfalo.....	34
4.2.3 – Carneiro.....	38
4.2.4 – Porco doméstico.....	44
4.2.5 – Porco do mato.....	48
5 – DISCUSSÃO.....	52
6 – CONCLUSÃO.....	59
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8 – ABSTRACT.....	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Número de amostras segundo a espécie, idade, local e ano de colheita do material sanguíneo, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	21
Tabela 2: Resultados das amostras positivas nas espécies estudadas, em relação aos testes de IDGA e BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	30
Tabela 3: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em bovinos baguás (<i>Bos taurus indicus</i> em estado feral) segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	33
Tabela 4: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, em soros de bovinos baguás (<i>Bos taurus indicus</i> em estado feral), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	34
Tabela 5: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em búfalos indianos (<i>Bubalus bubalis</i>) segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	36
Tabela 6: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, em soros de bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>) de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	37

Tabela 7: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em carneiro (<i>Ovis aries</i>), segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	39
Tabela 8: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, em soros de carneiro (<i>Ovis aries</i>), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	42
Tabela 9: Número de amostras positivas e média dos títulos de anticorpos anti-estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, em soros de carneiro (<i>Ovis aries</i>), de acordo com os diferentes locais de colheita, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	43
Tabela 10: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O ₁ Campos e A ₂₄ Cruzeiro de acordo com o teste BFL-ELISA, em porco doméstico (<i>Sus scrofa</i>), segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998	45
Tabela 11: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O ₁ Campos e A ₂₄ Cruzeiro, em soros de porco doméstico (<i>Sus scrofa</i>), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	46
Tabela 12: Número de amostras positivas e média dos títulos de anticorpos anti-estirpes O ₁ Campos e A ₂₄ Cruzeiro, em soros de porco doméstico (<i>Sus scrofa</i>), de acordo com os diferentes locais de colheita, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	47
Tabela 13: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em porco do mato (<i>Sus scrofa</i> em estado feral) segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	49

Tabela 14: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, em soros de porco do mato (<i>Sus scrofa</i> em estado feral), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	50
Tabela 15: Número de amostras positivas e média dos títulos de anticorpos anti-estirpes O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, em soros de porco do mato (<i>Sus scrofa</i> em estado feral), de acordo com os diferentes locais de colheita, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Grupo de porco do mato (<i>Sus scrofa</i> em estado feral) forrageando juntamente com um bovino, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense.....	14
Figura 2: Vista aérea da sub-região da Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, demonstrando as “baías” rodeadas por “cordilheiras” e na parte superior, à direita da foto, uma “vazante”.....	17
Figura 3: Mapa do Pantanal matogrossense e sulmatogrossense, evidenciando a região de estudo.....	18
Figura 4: Percentagem de amostras positivas nas espécies estudadas de acordo com os resultados encontrados nos testes de IDGA e BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	30
Figura 5: Amostras de soro de bovino baguá (<i>Bos taurus indicus</i> em estado feral) reagentes aos sorotipos O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	31
Figura 6: Amostras de soro de búfalo indiano (<i>Bubalus bubalis</i>) reagentes aos sorotipos O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial, segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998...	35
Figura 7: Amostras de soro de carneiro (<i>Ovis aries</i>) reagentes aos sorotipos O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	38
Figura 8: Amostras soropositivas de carneiro (<i>Ovis aries</i>) de acordo com os resultados do teste BFL-ELISA nos diferentes locais de colheita do material sanguíneo, segundo distribuição por faixa etária.....	40

Figura 9: Amostras de soro de porco doméstico (<i>Sus scrofa</i>) reagentes aos sorotipos O ₁ Campos e A ₂₄ Cruzeiro segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	44
Figura 10: Amostras soropositivas de porco doméstico (<i>Sus scrofa</i>) segundo os resultados do teste BFL-ELISA, nos diferentes locais de colheita do material sanguíneo.....	45
Figura 11: Amostras de soro de porco do mato (<i>Sus scrofa</i> em estado feral) reagentes aos sorotipos O ₁ Campos, A ₂₄ Cruzeiro e C ₃ Indaial segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.....	48
Figura 12: Amostras soropositivas de porco do mato (<i>Sus scrofa</i> em estado feral) segundo os resultados do teste BFL-ELISA, de acordo com o ano e local de colheita do material sanguíneo.....	50

RESUMO

A pesquisa sorológica usando Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e ELISA Bloqueio de Fase Líquida (BFL-ELISA) foram aplicadas nesse estudo no período de 1996 a 1998, para detectar ou titular, respectivamente, anticorpos contra o antígeno VIA (Virus Infection Associated) e as estirpes de referência O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em algumas espécies silvestres e domésticas susceptíveis e não vacinadas. Do total de 383 amostras sanguíneas colhidas, 78 amostras eram de bovinos de vida livre; 39 de búfalos indianos; 139 de ovinos; 63 de suínos domésticos; 49 de porcos do mato e 15 de cervídeos. Todas as espécies investigadas, exceto os cervídeos, apresentaram anticorpos contra o Vírus da Febre Aftosa (VFA). O teste de IDGA detectou 47 (12,3%) amostras positivas ao antígeno VIA, principalmente em bovinos baguás e búfalos. O BFL-ELISA identificou 175 (45,7%) soros com presença de anticorpos a uma das três estirpes virais. Foi encontrado um maior número de amostras positivas contra a estirpe C₃ Indaial bem como maiores títulos, em bovinos baguás. Os bubalinos e ovinos apresentaram uma maior reatividade contra as estirpes A₂₄ Cruzeiro e O₁ Campos, respectivamente, demonstrando maior número de soros reagentes. No entanto, ambas as espécies revelaram maiores títulos para a estirpe C₃ Indaial. Nos suínos domésticos e silvestres, predominou a reatividade a estirpe A₂₄ Cruzeiro. Em bovinos, a maior ocorrência de soros positivos ao teste de IDGA foi encontrada em animais entre 12 a 36 meses de idade, e na prova BFL-ELISA, em animais acima de 36 meses. Nas demais espécies, ambos os testes laboratoriais utilizados demonstraram um maior número de soros reativos em indivíduos adultos. Concluindo, a detecção de animais com presença de anticorpos contra o VFA em indivíduos não vacinados em espécies susceptíveis no Pantanal de Mato Grosso do sul, Brasil, principalmente os resultados em suínos adultos domésticos e silvestres, indicou a ocorrência de atividade viral e consequentemente a presença de animais portadores do vírus, nessa região.

1 – INTRODUÇÃO

A febre aftosa (FA) é uma doença infecciosa que acomete animais biungulados domésticos e selvagens, cujo agente etiológico é um vírus pertencente a família *Picornaviridae* e ao gênero *Aphtovirus*. É constituído por 7 tipos sorológicos e imunológicos distintos sendo que os sorotipos "O", "A" e "C", são encontrados na América do Sul, África, Ásia e raramente na Europa; os tipos "SAT 1", "SAT 2" e "SAT 3" ocorrem na África e o tipo "ASIA 1", é restrito à Ásia (WOODBURY, 1995; RUECKERT, 1996).

Em bovinos, suínos, ovinos e caprinos, a doença caracteriza-se, principalmente, por febre alta, erupções vesiculares na boca, espaço interdigital e úbere. Em ovinos, caprinos e bubalinos, as lesões são menos pronunciadas podendo passar despercebidas, principalmente nesta última espécie onde raramente são observados sinais clínicos da doença (BLOOD et al., 1983). Deformação dos cascos, mastite, miocardite, agalaxia e aborto também são apontados como sintomas da enfermidade. A mortalidade pode ser elevada em animais jovens e sem imunidade específica. Já nos animais adultos a recuperação se dá num período de 8 a 15 dias. Os búfalos, após a ocorrência de infecção pelo vírus da febre aftosa (VFA), podem se tornar portadores assintomáticos durante muitos anos, enquanto que os ovinos e caprinos podem permanecer portadores por cerca de 9 meses (VAN BEKKUN et al., 1959; SUTMÖLLER & GAGGERO, 1965; BLOOD et al., 1983).

Durante o período febril da enfermidade em bovinos, o vírus pode ser facilmente isolado de secreções e excreções, dos tecidos provenientes de lesões, bem como do muco esofágico-faríngeo através da passagem do copo coletor (teste de PROBANG), dos linfonodos, dos tecidos da região do palato mole, da medula óssea, do pâncreas e do sêmen, quando se tratar de animais portadores. Os suínos desenvolvem a enfermidade de forma aguda apresentando graves lesões nos cascos e focinho, porém não se tornam portadores (SUTMÖLLER et al., 1968; HYSLOP, 1970; BLOOD et al., 1983; WOODBURY, 1995).

A porta de entrada mais comum do vírus é a mucosa do trato respiratório superior, quando este é inalado sob a forma de aerossol e ainda, a infecção pode ser veiculada pela saliva, fezes, urina e leite contaminados. A disseminação da doença deve-se, principalmente, ao livre movimento e comércio de animais clinicamente afetados ou que estejam em período de incubação da doença, entre propriedades e regiões, ou através de produtos de origem animal contaminados e não adequadamente processados (HYSLOP, 1970; BLOOD et al., 1983; BARMAN et al., 1990; WOODBURY, 1995).

O VFA é resistente aos desinfetantes comuns bem como aos métodos de armazenamento utilizados no comércio de carne, podendo sobreviver por períodos relativamente longos, nos linfonodos e na medula óssea, em condições de pH neutro. Pode persistir em forragens contaminadas e no meio ambiente até um mês, dependendo da temperatura e pH desses locais. No entanto, esse vírus é destruído rapidamente em extremos de pH, ácido ou alcalino, sob a luz do sol e em condições de altas temperaturas (MINOR et al., 1991).

A partícula viral possui a forma icosaédrica, sem envelope lipo-proteico e é constituída por 4 peptídeos estruturais denominados de VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C), localizados mais externamente e o VP4 (1A), localizado mais internamente. O genoma consiste de uma fita simples de ARN de polaridade positiva contendo, aproximadamente, 8400 nucleotídeos e peso molecular de $2,5 \times 10^6$ Daltons. Na extremidade 3' encontra-se uma sequência de nucleotídeos poliadenilados denominada de Poli A e na extremidade 5', há uma proteína viral covalentemente ligada, que é denominada de VPg. Um segmento de resíduos de citosina (Poli C), divide o ARN genômico em 2 fragmentos: cadeia S (short) e L (long) sendo este último, responsável pela codificação ou informação genética para a síntese das proteínas estruturais e não estruturais do VFA (FORSS et al., 1984; DE MELLO & LA TORRE, 1984; BELSHAM, 1993; RUECKERT, 1996). Através de mecanismos de mutação e recombinação, o VFA pode dar origem a novas estirpes variantes que exibem diferenças na antigenicidade,

na imunogenicidade, na patogenicidade, na ação invasiva e na especificidade pelo hospedeiro (HYSLOP, 1970; BLOOD et al., 1983).

Do ponto de vista antigênico, o VFA é constituído por quatro componentes, denominados por antígenos 146S, 75S, 12S e VIA ("Virus Infeccion Associated"). O antígeno 146S é o próprio virion, ou seja, a partícula íntegra do vírus, constituída pelo ARN genômico e pelo capsídeo proteico. Possui um coeficiente de sedimentação de 146S e é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes tipo-específicos, sendo que essa capacidade é mantida mesmo depois que as partículas 146S são inativadas. O antígeno 75S (capsídeo vazio) é semelhante ao antígeno 146S, porém destituído de ARN genômico e tem um coeficiente de sedimentação de 75S. O antígeno 12S é um agregado proteico constituído pelas proteínas 1D, 1B e 1C. Apresenta coeficiente de sedimentação de 12S e a propriedade de induzir a formação de anticorpos precipitantes e fixadores de complemento, porém não de anticorpos neutralizantes, sem portanto, importância na imunização ativa contra o VFA (COWAN & TRAUTMAN, 1967). O quarto componente é o antígeno VIA, que é a própria RNA polimerase viral codificada pelo genoma viral (3D) e possui um coeficiente de sedimentação 3,8S. Não possui especificidade de tipo, já que precipita e fixa complemento com antissoros dos 7 tipos sorológicos do vírus (COWAN & GRAVES, 1966).

Nos primeiros trabalhos de investigação sobre a reatividade ao antígeno VIA, ficou demonstrado que somente animais infectados com o VFA, mas não os imunizados com vacinas contra FA, cujo vírus havia sido inativado pelo acetililenoimina (AEI), produziam anticorpos anti-antígeno VIA, daí a expressão "antígeno viral associado à infecção" (COWAN & GRAVES, 1966; GRAVES et al., 1968; McVICAR & SUTMÖLLER, 1970). Posteriormente, foi verificado que animais repetidamente inoculados com vacinas inativadas pelo AEI, também desenvolvem anticorpos anti-antígeno VIA (DAWE & PINTO, 1978; PINTO & GARLAND, 1979).

Trabalhos experimentais e à campo, têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o papel epidemiológico da presença do VFA em espécies domésticas e silvestres, passíveis ou não de apresentarem sintomatologia e lesões típicas da doença.

TRAPP (1945), em estudo experimental realizado no Brasil, constatou a susceptibilidade do veado campeiro (*Mazama americana*) à infecção pelo VFA, bem como a transmissão direta da doença de animal para animal, embora as condições laboratoriais de íntimo contato a que foram submetidos os animais, não são condizentes com o que acontece na natureza. Exames *post-mortem* revelaram miocardite difusa, estase acentuada e edema em ambos os pulmões, estase nos rins e

fígado, tumefação aguda do baço, ulcerações na língua e descolamento parcial dos cascos.

FORMAN & GIBBS (1974) citado por JEREZ & PINTO (1979) estudaram, em condições experimentais, a infecção pelo VFA em 3 espécies de cervídeos (*Cervus elaphus*, *Dama dama* e *Capreolus capreolus*), comuns na Grã-Bretanha. Os animais foram inoculados, deixados em contato direto com a mesma espécie e com suínos infectados. Sinais clínicos brandos ou inaparentes foram observados em *Cervus elaphus* e *Dama dama* e acentuados em *Capreolus capreolus* sendo que, neste último, foi possível o isolamento viral até 63 dias pós infecção (dpi) em material esofágeo-faríngeo. Os resultados encontrados permitiram inferir que estas três espécies de cervídeos poderiam desempenhar importante papel na disseminação da infecção pelo VFA.

Na Inglaterra, LAWMAN et al. (1978) pesquisaram a presença de anticorpos contra vários agentes infecciosos em cervídeos de vida livre (*Cervus elaphus*, *Cervus nippon*, *Dama dama*, *Capreolus capreolus* e *Hydropotes inermis*) e não encontraram amostras soropositivas para as estirpes "O", "A" e "C" do VFA, pela prova de soroneutralização.

SHIMSHONY et al. (1986), em Israel, descreveram um surto de FA de grandes proporções em gazelas (*Gazella gazella*) ocorrido em abril de 1985. A doença atingiu animais de todas as idades e de ambos os sexos. Lesões orais foram observadas em todos os animais examinados. Muitos apresentaram lesões nos cascos e foram encontrados mortos próximos a fontes de água. Na necrópsia foram constatadas alterações musculares e cardíacas, pneumonia e esplenomegalia. A maioria dos animais examinados encontrava-se em ótimas condições nutricionais, indicando que o curso da doença foi agudo. O vírus isolado foi do tipo "O" e estimou-se que 1.500 animais tenham morrido, representando uma taxa de mortalidade em torno de 50%.

ARAÚJO JÚNIOR & DUARTE (2000) pesquisaram 117 Cervos do Pantanal em área próxima a Usina Hidroelétrica de Porto Primavera para detecção de anticorpos contra uma ou mais das três estirpes virais de referência e verificação de possível estado de portador nessa espécie. Utilizando os testes de BFL-ELISA, PCR e isolamento viral, encontraram em 37, dos 117 animais analisados, anticorpos apenas para a estirpe "A", segundo a prova de BFL-ELISA.

Em estudo experimental, GOMES & ROSENBERG (1984) infectaram com o VFA do tipo "O", por via intramuscular, uma capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), colocando-a em contato com outras capivaras e bovinos. Decorridos alguns dias, todos os animais desenvolveram lesões clínicas típicas da doença, sendo o VFA isolado de

vísceras, fezes e de material esofágico-faríngeo. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que, em condições de laboratório, há possibilidade de transmissão da doença pela capivara a outras espécies animais.

Devido à característica de abrigarem o VFA durante um longo tempo, sem que haja o desenvolvimento de sintomatologia clínica, os búfalos africanos (*Syncerus caffer*) e indianos (*Bubalus bubalis*) têm sido as espécies mais bem estudadas na epidemiologia da FA, por serem considerados como os mais importantes reservatórios do VFA, atuando como possível fonte de infecção para outras espécies de animais domésticos (HEDGER et al., 1969; HYSLOP, 1970; HEDGER, 1976; SAMARA & PINTO, 1983; ESTERHUYSEN et al., 1985; ANDERSON, 1986; BENGIS et al., 1986; SAMARA et al., 1987; PASTORET et al., 1988; ANDERSON et al., 1993; DAWE et al., 1994a; DAWE et al., 1994b).

Nocard & Leclainche em 1903 (apud URBAIN et al., 1938), relacionaram os bubalinos no rol dos animais susceptíveis de infecção pelo VFA.

Em 1938, URBAIN et al., descreveram a ocorrência de um surto de FA no Parque Zoológico de Vincennes, em Paris, ocasião em que foram acometidos pela doença, bisão do Indústão (*Bos bibos gaurus*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), gayal (*Bos frontalis*) e bisão americano (*Bos americanus*). Entre tais espécies, os búfalos foram os únicos que apresentaram a doença clínica de forma branda.

MACAULAY (1963, 1964), em artigos de revisão sobre FA em animais não domésticos, relacionam 29 espécies silvestres susceptíveis a essa enfermidade. Entre tais espécies, estão incluídos os búfalos africanos e indianos e, segundo esse autor, o contato de animais silvestres portadores do VFA com bovinos pode originar uma epizootia da doença.

Na África, em um inquérito sorológico realizado com 1323 amostras de soros de 39 espécies de animais silvestres colhidas durante cinco anos, CONDY et al. (1969) observaram que 16 espécies apresentavam anticorpos neutralizantes para um ou mais tipos de VFA, dentre as quais, os búfalos africanos foram os que apresentaram os títulos mais elevados em anticorpos.

Na Rodésia e em Botswana, HEDGER et al. (1969) realizaram uma pesquisa do VFA com colheita do muco esofágico-faríngeo (PROBANG) e isolaram 5 estirpes distintas do vírus em um total de 25 amostras de búfalos africanos destes países. Em vista disso, os autores levantaram a hipótese do importante papel dessa espécie como possível perpetuadora e disseminadora da infecção pelo VFA para outras populações de animais silvestres susceptíveis.

HEDGER et al. (1972) inocularam em búfalo africano, gnu (*Connochaetes taurinus*), Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), impala (*Aepycerus melampus*), javali

(*Phacocoerus aethiopicus*), porco do mato (*Potamochoerus porcus*) e elefante (*Loxodonta africana*) mantidos em uma área apropriada, uma suspensão do VFA tipo "SAT 2", oriunda de um surto dessa enfermidade em bovinos. Tais animais foram mantidos em contato com bovinos, utilizados como controle. A doença clínica foi severa nos bovinos controles, kudus, javalis e porcos do mato, porém, o estado de portador somente foi observado nos bovinos, kudus e búfalos africanos. Os gnus e o elefante não apresentaram lesões, nem anticorpos contra o VFA. Diante dos resultados encontrados, os autores enfatizam a complexidade do problema em áreas onde a FA é endêmica e onde diversas espécies animais de variada susceptibilidade estão em processo de interação.

Na tentativa de comprovar a transmissão do VFA de búfalo africano para bovino, CONDY & HEDGER (1974) mantiveram búfalos seguramente portadores do vírus, confinados durante dois anos e meio, com bovinos. A transmissão dos bubalinos aos bovinos envolvidos no experimento não ocorreu, embora nos búfalos tenha sido detectado altos títulos de anticorpos neutralizantes e isolado o vírus do muco esofágico-faríngeo, caracterizando o estado de portador nesta espécie. Os bovinos não apresentaram sinais clínicos da doença ou anticorpos neutralizantes, bem como, não foi isolado vírus do muco esofágico-faríngeo. Entretanto, esses autores demonstraram a transmissão da enfermidade de búfalo para búfalo.

O envolvimento do impala e do gnu na perpetuação e disseminação do VFA foi estudado por ANDERSON et al. (1975). A inoculação, por via intradermolingual, de uma estirpe do tipo "O" adaptada a bovino, em impalas e gnus, não resultou em sinais clínicos nos impalas, mas lesões brandas e atípicas foram observadas na língua e cascos de 2 gnus. A viremia foi comprovada em todos os impalas e em apenas um gnu. A resposta imune humoral específica também foi observada nas duas espécies, sem contudo ter sido isolado vírus em nenhuma delas após o 7º dia de incubação, não caracterizando, portanto, o estado de portador.

HEDGER (1976) em 1962, após uma operação de resgate na Rodésia, testou 3163 soros de 47 espécies contra os tipos "SAT 1", "SAT 2" e "SAT 3" do VFA. Dezoito espécies mostraram possuir níveis significativos de anticorpos segundo o teste de soroneutralização sendo que os títulos mais altos foram encontrados em búfalos africanos.

PINTO & HEDGER (1978) após infecção natural e experimental com o VFA, pesquisaram a ocorrência de anticorpos anti-antígeno VIA através da prova de Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar (IDGA) e de anticorpos soroneutralizantes em animais selvagens africanos. Além disso, realizaram isolamento do vírus a partir de amostras de muco esofágico-faríngeo. De 432 soros de búfalos africanos de vida livre

analisados, 429 foram positivos a, no mínimo, um dos três tipos da estirpe "SAT", segundo os testes de soroneutralização; dos quais, 350 apresentaram anticorpos anti-antígeno VIA na prova de IDGA e ainda, em 283 amostras conseguiu-se o isolamento viral. Também foi capturado um grupo de 6 búfalos africanos de vida livre com 3 meses de idade e sem sinais clínicos da doença. A reação ao antígeno VIA foi detectada em todos os animais quando tinham 3 meses de idade, em 4, quando possuíam 4 ½ meses e em somente 1 quando atingiu 6 meses de idade. Foram feitas várias tentativas, sem sucesso, para o isolamento viral e concluiu-se que a presença de anticorpos anti-antígeno VIA havia sido adquirido em fêmeas infectadas. Na fase experimental desse estudo, foram infectados com a estirpe "SAT 1", búfalos africanos, kudus, impalas, porcos do mato e gnus. Anticorpos foram detectados aos 17 dpi em búfalos, kudus e impalas, porém, nessa última espécie, os títulos soroneutralizantes diminuíram rapidamente, ao contrário dos búfalos e kudus, os quais se tornaram portadores. Os porcos do mato e javalis revelaram-se soropositivos, aos 45 dpi, mas não se tornaram portadores.

Na Índia, HAJELA & SHARMA (1978) descreveram a ocorrência de um surto atípico de FA provocado por vírus do tipo "A" em uma criação mista de búfalos indianos com bovinos. Nos animais acometidos pela doença, foram observadas lesões na boca e no espaço interdigital.

Em fazendas do Quênia, PALING et al. (1979) pesquisaram a presença de anticorpos soroneutralizantes para o VFA em búfalos africanos, antílopes (*Taurotragus orix*), ovinos, caprinos e bovinos. A presença de anticorpos anti-VFA nos búfalos e nos antílopes foi interpretado como sendo de infecção natural, enquanto que nas outras espécies, devido a infecção ou a vacinação.

Em São Paulo, JEREZ et al. (1979) investigaram soros de búfalos indianos vacinados tri-anualmente com vacinas comerciais inativadas pelo AEI e tentaram o isolamento viral a partir de material esofágico-faríngeo. No total, foram examinados 379 amostras de soros colhidos 60 dias após vacinação sendo encontradas 86 amostras (23,0%) reagentes ao antígeno VIA. Do total de positivos, foram escolhidos, aleatoriamente, sete animais para a prova de PROBANG e processamento do isolamento viral. Em dois materiais, foi isolado VFA do tipo "C". Neste estudo, a presença de anticorpos anti-antígeno VIA tanto poderia ser infecciosa como vacinal, porém os autores concluem que, a presença de vírus no material esofágico-faríngeo indicou contato prévio desses animais com o VFA, embora não tivessem manifestado sinais sugestivos da doença.

SAMARA et al. (1981) pesquisaram anticorpos anti-antígeno VIA em búfalos indianos, ovinos e caprinos, em propriedades e municípios diferentes no Estado

de São Paulo. Nas 157 amostras colhidas de búfalos vacinados, foram encontrados 81 (51,5%) animais reagentes ao VIA. Em uma das propriedades havia ocorrido um surto de FA em bovinos e, conseqüentemente, houve maior número de animais positivos (20/21). Não foram observados sinais clínicos da doença em nenhum dos animais amostrados. Para ovinos, foi analisado uma total de 370 soros, sendo que, 161 animais não eram vacinados e 209 haviam recebido a vacina há mais de 60 dias. Após os exames, 20 animais foram positivos ao VIA, dos quais, quatro haviam sido vacinados e o restante era proveniente do grupo de animais não vacinados. Houve maior número de ovinos positivos na propriedade onde ocorreu o surto em bovinos. Dos 180 soros de caprinos colhidos, 130 não eram vacinados e 20 (5,4%) animais deste grupo reagiram positivamente ao antígeno VIA. Os 50 animais restantes, haviam sido vacinados há mais de 60 dias e não apresentaram positividade ao teste. Também para caprinos, em uma das propriedades amostradas havia ocorrido surto de FA em bovinos 10 meses atrás, porém não foi encontrado animal positivo nesta fazenda. Os autores discutem esse resultado como sendo a baixa sensibilidade do teste ou a queda no título de anticorpos após os 10 meses.

SAMARA & PINTO (1983) descreveram um surto de FA que acometeu duas fazendas ("A" e "B") no Estado de São Paulo. Na fazenda "A" criavam-se bovinos e búfalos e na fazenda "B", predominava a criação de suínos, embora houvesse também alguns bovinos e bubalinos. Lesões típicas da FA foram observadas nos bovinos e suínos, porém os búfalos não apresentaram nenhuma sintomatologia clínica da doença. O VFA do tipo "A" foi isolado 21 a 30 dias após o surgimento do surto em 2 dos 10 búfalos amostrados na fazenda "A" e em 2 dos 8 búfalos amostrados na fazenda "B". Resultados mostraram que as estirpes isoladas na mesma propriedade eram iguais, porém diferiam completamente quando comparadas com as estirpes isoladas da outra propriedade. Concluíram esses autores que a transferência do VFA, de bovinos e suínos contaminados, para búfalos, pode ocorrer em condições de íntimo contato entre essas espécies animais.

YOUNG et al. (1985) observaram sintomatologia clínica de FA desenvolvida em bovinos, bubalinos e caprinos, durante um surto em 1983, em Java. O último caso da doença datava de 1979 e havia 4 anos que não ocorria febre aftosa na região. Primeiramente, foram examinados 80 bovinos e 20 bubalinos na área central de Java. Posteriormente, apareceram mais 15 búfalos e 3 carneiros com sinais clínicos evidentes de infecção, na região oeste. A severidade das lesões em bovinos e bubalinos foram semelhantes, ao contrário dos carneiros que desenvolveram sinais bem menos evidentes.

No Zimbabwe, entre o período de 1989 a 1992, 7.970 ungulados selvagens, compreendendo um total de 14 espécies animais, foram estudados, utilizando-se o teste ELISA de Bloqueio de Fase Líquida para pesquisa da presença de anticorpos para as estirpes "SAT 1", "SAT 2" e "SAT 3" do VFA (ANDERSON et al., 1993). Desse total, 103 (1,2%) animais apresentaram anticorpos, principalmente para o vírus tipo "SAT 1", incluindo o impala, elande (*Taurotragus oryx*), waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*) e zibelinas (*Hippotragus niger*).

Ainda, DAWE et al. (1994a) observaram a transmissão experimental do VFA do búfalo africano ao gado bovino. Os búfalos foram infectados experimentalmente com vírus do tipo "SAT 2" do VFA e deixados em contato com bovinos. Durante a fase aguda da doença nos búfalos, os bovinos não apresentaram sinais clínicos nem a presença de anticorpos no soro. Contudo, cinco meses após a infecção, apareceram lesões características de FA. O seqüenciamento de nucleotídeos das estirpes isoladas tanto dos búfalos, quanto dos bovinos, mostraram grande semelhança entre si.

Posteriormente, DAWE et al. (1994b), estudaram um surto de FA transmitido naturalmente do búfalo africano para o bovino doméstico, na mesma região. Segundo esses autores, búfalos foram vistos bebendo água da mesma fonte dos bovinos, poucos dias antes de ter surgido o primeiro caso da doença no rebanho. Os bovinos haviam sido imunizados com vacina inativada contra os tipos "SAT 1", "SAT 2" e "SAT 3", contudo apresentaram lesões severas. O seqüenciamento de nucleotídeos do genoma das estirpes do vírus "SAT 1" provenientes dos bovinos e dos búfalos revelou pouca diferença entre elas. A transmissão do vírus pelo ar, por pessoas contaminadas e por contato com outros animais infectados foi descartada, pois os bovinos eram originários de uma região livre de FA e não tinham estado em contato direto com outros bovinos durante 5 anos.

O papel na epidemiologia da FA de espécies de bi-ungulados domésticos como ovinos, caprinos e suínos tem sido estudado. Dessa forma, FERNANDEZ & FERNANDES (1970) realizaram um estudo experimental utilizando 167 ovinos de 9 a 12 meses e bovinos de 12 a 30 meses. Foi inoculada, por via intradermolingual em carneiros, uma suspensão viral da estirpe "O₁ Caseros" e observada a adaptação do vírus a esses animais. Essa estirpe viral, que era muito patogênica em bovinos e suínos, mostrou-se mais branda quando inoculada em ovinos. Neste mesmo trabalho, os autores descrevem, resumidamente, um surto à campo em 55 carneiros com as mesmas características dos que foram usados na pesquisa, causado pela mesma estirpe viral do experimento. As lesões foram demonstradas em somente 4 animais,

sendo que em 2, foram detectadas vesículas na língua e cascos; 1, apresentou lesões somente em um casco e no quarto animal, houve pequena lesão na gengiva.

Durante o curso de uma epidemia de FA em Malta no ano de 1975, GARLAND et al. (1981) relatam os resultados de estudos realizados em três visitas ao local com a finalidade de detectar em bovinos, carneiros, cabras e suínos, a extensão de infecção inaparente e do efeito da vacinação sobre animais portadores do VFA. O isolamento do vírus tipo "O", responsável pelo surto, foi conseguido em somente 3 das 278 amostras de muco esofágico-faríngeo colhidas de ruminantes durante o surto. Nenhum vírus foi isolado do muco esofágico-faríngeo de 305 amostras colhidas dois meses depois do último caso do aparecimento da doença. Anticorpos anti-antígeno VIA foram detectados somente em 11 de 196 amostras de soros colhidas em propriedades consideradas de alto risco durante o surto e em 12 de 379 amostras colhidas na segunda visita, enquanto que todas as 97 amostras séricas colhidas na terceira visita, realizada um ano mais tarde, revelaram-se negativas para o antígeno VIA.

ABU ELZEIN et al. (1987) pesquisaram através das provas de IDGA e ELISA indireto, a presença de anticorpos, respectivamente contra o antígeno VIA e contra o VFA em bovinos, ovinos e caprinos no Sudão, em amostras de soros colhidas em 11 localidades diferentes. Em bovinos, a maioria dos animais apresentou reatividade aos tipos "O" e "A", seguido da reatividade ao tipo "SAT 1" do VFA. Animais positivos para o tipo "SAT 2" foram detectados somente em um local. Em ovinos, foram encontrados animais soropositivos em 7 locais, também predominando os reagentes aos tipos "O" e "A". Em apenas 4 locais foram encontrados caprinos positivos, sendo a reatividade para o tipo "O", a mais observada. A positividade ao tipo "SAT 2" não foi demonstrada em caprinos, bem como não foram detectados animais reagentes ao tipo "C" em nenhuma das espécies estudadas.

No Quênia, NDARATHI (1991) pesquisou 162 soros de ovinos e caprinos e 230 de bovinos criados em uma área onde animais domésticos e selvagens como gazela, búfalo, gnu e girafa, pastavam juntos. Foi demonstrado que todos os soros (100%) de ovinos e caprinos possuíam altos títulos de anticorpos neutralizantes para os tipos "O", "A" e "SAT 1", enquanto que 44% foram positivos para o "SAT 2". Nos bovinos, 90% dos soros apresentaram títulos significativos para o tipo "O"; 91% para o "SAT 1"; 48% para o "A" e 58% para o "SAT 2". Durante o desenvolvimento deste estudo, ao contrário dos bovinos, ovinos e caprinos não apresentaram sintomas clínicos da doença e foi questionado o papel de portador assintomático dessas espécies na epidemiologia da FA.

HANCOCK & PRADO (1993) descreveram um surto ocorrido em 1990, no Rio Grande do Sul, envolvendo ovinos, bovinos e suínos afetando 4 propriedades

rurais. A doença em bovinos acometeu somente animais até 12 meses de idade, os quais não haviam sido vacinados conforme a legislação vigente. A perda de animais foi mais severa em ovinos que apresentaram claudicação, caquexia e aborto sem aparecimento de lesão oral, tendo ainda sido possível detectar vírus nessa espécie 190 dias após o surto.

MACAULAY (1963) descreveu trabalhos realizados em 1933 e 1943, onde foi isolado vírus e encontrado lesões severas na língua, focinho e patas em porcos do mato no Quênia. Durante esses estudos, foi verificado a transmissão da doença de suínos para bovinos domésticos.

Na Índia, SHANKAR (1982) descreveu um surto de FA ocorrido no "Indian Veterinary Research Institute" acometendo 173 de um total de 294 suínos domésticos. Os animais apresentaram prostração, anorexia, vesículas nas narinas, língua e cascos. A doença pode ter tido origem em bezerros utilizados como teste de vacinas anti-aftosa, trazidos de outro câmpus, e que mostraram sintomas dessa enfermidade alguns dias antes ou pode ter sido causada pelo movimento de pessoas e veículos dentro do Instituto.

Outro surto, também na Índia, em suínos da raça Landrace e Yorkshire foi descrito por UPPAL et al. (1983). A taxa de morbidade encontrada foi de 51,21% e a de mortalidade 19,4% numa população de 1.155 animais, ocorrendo em todas as idades e em ambos os sexos. Foi isolada a estirpe "O" do VFA a partir de lesões cardíacas e do coxim plantar dos animais infectados.

No Estado de São Paulo, Brasil, TERRERAN et al. (1984) estudaram a susceptibilidade de bovinos e suínos à uma estirpe de campo do tipo "A" do VFA, proveniente de um surto ocorrido no município de Jaboticabal o qual, provavelmente, teve origem em um matadouro acometendo 11.945 suínos de um total de 12.693, sendo que, 5.379 animais (42,2%) morreram. Dos 2.239 bovinos existentes, 1.018 animais desenvolveram a doença de forma branda. O vírus isolado, do tipo "A", foi utilizado para inoculação experimental nas espécies envolvidas no surto. Os porcos desafiados desenvolveram sintomatologia de FA e as novilhas não apresentaram nenhuma alteração clínica ou patológica, embora tenha sido verificado a presença de anticorpos anti-VIA, 21 dias após a infecção. O fato de a doença ter acometido muito mais o rebanho suíno do que o bovino, levou os pesquisadores a considerarem duas hipóteses: a vacinação obrigatória dos bovinos teria conferido a esses animais a proteção necessária, ou a estirpe do vírus envolvido nesse surto possuiria uma maior afinidade e virulência para a espécie suína.

CHAMNANPOOD et al. (1995), na Tailândia, relataram os resultados de uma pesquisa epidemiológica da FA iniciada em 1990 pelo Departamento de Defesa

Sanitária no Norte do país. O intuito do trabalho era estudar o envolvimento de porcos em surtos de FA e sua função na dispersão da doença. As informações foram colhidas através de questionário aplicado em 60 cidades selecionadas, levantando dados sobre o número de surtos 5 anos antes deste estudo; data mais recente do aparecimento da doença e prováveis origens; número de porcos acometidos, mortos ou abortados e monitoramento sorológico (em algumas cidades) utilizando-se os testes de soroneutralização (SN) e ELISA. Em 58/60 cidades pesquisadas, foi constatado que somente bovinos e bubalinos foram acometidos pela FA. Em 3/5 cidades cujos porcos desenvolveram a doença, a morbidade foi de, aproximadamente, 10% e nos outros 2 municípios, chegou a atingir 40 e 100%, respectivamente. Em uma dessas cidades, o início da enfermidade foi atribuído à introdução de suínos infectados. A doença se dispersou para outros porcos e, posteriormente, para bovinos acometendo 30% desses animais. A morbidade entre os suínos adultos atingiu 100% e 10% dos leitões vieram a óbito. O sorotipo "O" foi mais comumente envolvido nos surtos.

Com relação ao Estado de Mato Grosso do Sul, em fevereiro de 1998, houve ocorrência da doença na região de Porto Murtinho, divisa com o Paraguai, acometendo bovinos e suínos em 2 propriedades próximas. Os animais enfermos apresentaram claudicação e ulceração na gengiva, língua e no espaço interdigital em diferentes estágios de evolução. Os 64 ovinos em contato direto com os bovinos não apresentaram sintomas, porém foram abatidos juntamente com 1690 bovinos e 14 suínos como uma das medidas adotadas para controle do foco. O diagnóstico laboratorial foi feito através dos testes de IDGA em soro de suínos e bovinos doentes e isolamento viral em amostras de epitélio bovino, tendo como resultado a tipificação da estirpe "O₁" do VFA (DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA, 1998).

Em janeiro de 1999, a enfermidade volta a se manifestar no município de Naviraí, Sul do Estado. Assim como no foco de Porto Murtinho, os bovinos e suínos apresentaram graves sintomas da doença em 2 propriedades vizinhas. Os ovinos não apresentaram sinais clínicos. Foram amostrados epitélio lingual e soro dos animais acometidos e o diagnóstico do VFA resultou no tipo "O₁" (DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA, 2000, no prelo).

Já na região Pantaneira, com o objetivo de fazer uma avaliação epidemiológica da FA na região, MATHIAS et al. (1981), no período de janeiro a março de 1980, analisaram 1.330 soros bovinos pertencentes a 61 boiadas que saíram do Pantanal com destino a outras regiões dentro e fora do Estado. As provas sorológicas aplicadas foram a Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar para detecção de anticorpos anti-antígeno VIA e a microneutralização em placas, para pesquisa de anticorpos neutralizantes. Foram encontrados 560 (42%) animais positivos, sendo o tipo "O",

predominante. A comparação entre as médias dos títulos de anticorpos entre as faixas etárias, revelou a predominância de animais reagentes a estirpe "O" em animais menores de 3 anos e para as estirpes "A" e "C", nos bovinos entre 3 a 5 anos de idade. Considerando que a maior parte dos animais estudados eram primo-vacinados, que a maioria das boiadas era infectada e não protegida e, devido a grande comercialização de gado pantaneiro para regiões dentro e fora do Estado, chegou-se a conclusão que a área de estudo, possivelmente, consistiria num ecossistema endêmico de FA e com alto risco de disseminação da doença.

Em agosto de 1994, segundo o Boletim de Ocorrência de FA número 4861 do Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul (IAGRO/MS), foi relatado um foco da doença no município de Corumbá em um lote de 351 bovinos adquiridos num Leilão na região da Nhecolândia. Destes, 30 animais apresentaram sintomatologia clínica. O exame laboratorial demonstrou o vírus tipo "O" em material podal e lingual. A doença ficou restrita a este lote de bovinos não havendo transmissão para outras espécies nem para outras fazendas.

Em 1995, o IAGRO/MS realizou um inquérito sorológico para FA no Pantanal-Sulmatogrossense, com o objetivo principal de avaliar a eficácia da vacinação anti-aftosa no que se refere ao seu efeito de reduzir a prevalência da infecção pelo VFA na região. O número de amostras estudadas correspondeu a 3.885 bovinos domésticos, rotineiramente vacinados contra FA e com idade até 12 meses e entre 13 e 24 meses, colhidas em 311 propriedades. Numa primeira análise, foram encontrados 474 (12%) animais soropositivos no teste de IDGA, ao antígeno-VIA. Esses mesmos soros foram posteriormente submetidos a outras provas sorológicas, como o EITB – "Enzyme-linked immunoelectrotransfer Blot" e o ELISA – "Enzyme-linked immunosorbent Assay") e o número de indivíduos infectados diminuiu para 12 (0,3%). Esses resultados indicaram uma baixíssima prevalência da infecção pelo VFA em bovinos domésticos, com idade inferior a 24 meses, na região pantaneira (MORAES et al. 1997).

Vale ressaltar, no entanto, a interação entre animais domésticos e silvestres, susceptíveis à infecção pelo VFA, à semelhança do que tem sido observado em alguns países africanos, ocorre com frequência na região do Pantanal. Várias espécies susceptíveis ao VFA, como veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), veado mateiro (*Mazama americana*), cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), porco do mato (*Sus scrofa*), cateto (*Tayassu tajacu*) e queixada (*Tayassu pecari*), podem ser observadas em estreito contato com animais domésticos vacinados e não vacinados, em condições naturais (Figura 1).

Diante de todo o exposto e tendo em vista a escassez de informações a respeito da problemática da FA no Pantanal de Mato Grosso do Sul, julgamos importante do ponto de vista do controle sanitário dessa enfermidade, a realização de um estudo sorológico envolvendo a pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA e de anticorpos contra as estirpes de referência O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial do VFA, em algumas espécies domésticas e silvestres não submetidas à vacinação obrigatória contra FA.



Figura 1: Grupo de porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral) forrageando juntamente com um bovino, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense.

2 - OBJETIVO

Pesquisar a presença de anticorpos contra o VFA em algumas espécies de animais silvestres e domésticas susceptíveis e não vacinadas, por meio das técnicas de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), para a detecção de anticorpos anti-antígeno VIA e da técnica de ELISA Bloqueio de Fase Líquida (BFL-ELISA), usada para a detecção e titulação de anticorpos contra as estirpes de referência O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial.

Titular os anticorpos nas amostras classificadas como positivas pelo BFL-ELISA com diluição única, contra as estirpes de referência O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial.

Comparar os resultados das análises sorológicas obtidos para cada uma das espécies animais em estudo, entre as diferentes faixas etárias e locais de colheita das amostras.

3 – MATERIAIS E MÉTODO

3.1 – Descrição do Local

O presente estudo foi realizado com amostras de soro sanguíneo colhidas de animais que vivem na sub-região da Nhecolândia, no município de Corumbá/MS (Figura 3).

Trata-se de região formada por campos limpos, cerrados, “vazantes”, “salinas”, e “baías” (ALLEM & VALLS, 1987). Essas últimas, são lagoas de água doce, temporárias ou permanentes, que variam desde poucas dezenas de metro até 1 a 2 Km de diâmetro (ADÁMOLI, 1987). Recebem a denominação de “salina”, quando são de água salgada. Ao redor desses corpos hídricos, encontra-se uma vegetação arbórea densa chamada localmente de “cordilheira” que, por se localizar em terreno mais elevado, fica livre da inundação constituindo-se em refúgio para os animais na época da enchente (Figura 2).

As “vazantes”, se formam no auge das chuvas, ligando uma baía a outra e não possuem leito definido. Na época da seca, a maioria desaparece dando lugar aos campos nativos da região (ALLEM & VALLS, 1987).

A vegetação da Nhecolândia é formada por gramíneas e leguminosas de porte baixo, adaptadas a pobreza do solo, aos longos períodos de alagamento e estiagem e a queima. O solo é formado pelo leque aluvial do Rio Taquari, caracterizado por sedimentos areno-silicosos (POTT, 1981). Além dessas formações, encontra-se ainda na região a presença de “corixos”, que são cursos de água possuidores de leito acanalado. Na época da seca, eles diminuem de volume mas não desaparecem (ALLEM & VALLS, 1987).



Figura 2: Vista aérea da sub-região da Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, demonstrando as “baías” rodeadas por “cordilheiras” e na parte superior, à direita da foto, uma “vazante”.

Os búfalos indianos (*Bubalus bubalis*), totalizaram 39 amostras colhidas em 1998, sendo que, 34 (87,2%) pertenciam a Fazenda "A" e 5 (12,8%), a Fazenda "G". Treze (33,3%) animais foram agrupados na faixa etária até 12 meses; 7 (18,0%), entre 12 e 36 meses e 19 (48,7%) acima de 36 meses de idade.

Foram colhidos 39 (28,1%) soros de carneiro (*Ovis aries*), na Fazenda "A", 47 (33,8%), na Fazenda "C", 41 (29,5%), na Fazenda "D" e 12 (8,6%), na Fazenda "F", totalizando 139 amostras colhidas no ano de 1998. A faixa etária até 3 meses de idade era composta por 7 (5,0%) animais, entre 3 meses a 12 meses, por 30 (21,6%) animais e com mais de 12 meses de idade, por 102 (73,4%).

Quarenta e oito (76,2%) e 15 (23,8%) amostras de soro de porco doméstico (*Sus scrofa*) foram colhidas somente no ano de 1998, nas Fazendas "A" e "B", respectivamente, totalizando 63 amostras, distribuídas nas faixas etárias: 1 (1,6%) soro conseguido de um animal com menos de 2 meses de idade; 26 (41,3%) soros de animais entre 2 a 7 meses e 36 (57,1%) soros de animais com idade acima de 7 meses.

De porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral), foi colhido um total de 49 soros, dos quais, 11 (22,4%) foram obtidos no ano de 1994, 11 (22,4%), em 1996 e 27 (55,2%), no ano de 1998. Deste total, 4 (8,7%) eram de animais de até 2 meses de idade, 13 (28,3%), de animais entre 2 a 7 meses e 29 (63,0%) de animais com mais de 7 meses de idade. Três animais não tiveram sua idade identificada. As colheitas foram efetuadas nas Fazendas "A" e "E", totalizando 31 (63,3%) e 18 (36,7%) amostras, respectivamente. Somente na Fazenda "A", houve amostragem nos três anos citados acima. Na Fazenda "E", todas as amostras datavam de 1998.

O grupo dos cervídeos foi constituído por 7 veados campeiros (*Ozotocerus bezoarticus*), 7 veados catingueiros (*Mazama goazoubira*) e 01 cervo do Pantanal (*Blastoceros dichotomus*), totalizando 15 amostras. A captura ocorreu nas Fazendas "A" e "B" com 12 (80,0%) e 3 (20,0%) animais, respectivamente, sendo que, sete (46,7%) animais foram capturados no ano de 1996 e 8 (53,3%), em 1997. Quanto a idade, 2 (18,2%) animais foram identificados como sub-adultos, 9 (81,8%), como adultos e 4 não tiveram sua idade determinada.

As amostras colhidas a campo, foram devidamente identificadas, dessoradas à temperatura ambiente, acondicionadas sob refrigeração até o transporte ao laboratório, quando os soros obtidos foram inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e, posteriormente, armazenados a -20°C, até serem submetidos à análise sorológica. Nenhuma das espécies em estudo era vacinada contra a FA.

Com a finalidade de apresentar os dados de maneira mais racional, os animais foram agrupados, de acordo com a idade, em 3 categorias: lactente (fase

pré-desmame), jovem (fase pós-desmame) e adulto (fase reprodutiva). A Tabela 1, relaciona as espécies utilizadas no presente estudo de acordo com a idade, local e ano de colheita.

Tabela 1: Número de amostras segundo a espécie, idade, local e ano de colheita do material sanguíneo, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

	<i>Boi baguá</i>	<i>Búfalo</i>	<i>Carneiro</i>	<i>Porco doméstico</i>	<i>Porco do mato</i>	<i>Cervídeos</i>	<i>Total</i>
Número de amostras	78 (20,4%)	39 (10,2%)	139 (36,3%)	63 (16,4%)	49 (12,8%)	15 (3,9%)	383 (100%)
Idade							
lactente	8 (10,3%)	13 (33,3%)	7 (5,0%)	1 (1,6%)	4 (8,7%)	—	33 (8,8%)
jovem	26 (33,3%)	7 (18,0%)	30 (21,6%)	26 (41,3%)	13 (28,3%)	2 (18,2%)	104 (27,6%)
adulto	44 (56,4%)	19 (48,7%)	102 (73,4%)	36 (57,1%)	29 (63%)	9 (81,8%)	239 (63,6%)
Fazenda							
"A"	—	34 (87,2%)	39 (28,1%)	48 (76,2%)	31 (63,3%)	12 (80,0%)	164 (42,8%)
"B"	78 (100%)	—	—	15 (23,8%)	—	3 (20,0%)	96 (25,1%)
"C"	—	—	47 (33,8%)	—	—	—	47 (12,3%)
"D"	—	—	41 (29,5%)	—	—	—	41 (10,7%)
"E"	—	—	—	—	18 (36,7%)	—	18 (4,7%)
"F"	—	—	12 (8,6%)	—	—	—	12 (3,1%)
"G"	—	5 (12,8%)	—	—	—	—	5 (1,3%)
Ano							
1994	—	—	—	—	11 (22,4%)	—	11 (2,9%)
1996	—	—	—	—	11 (22,4%)	7 (46,7%)	18 (4,7%)
1997	—	—	—	—	—	8 (53,3%)	8 (2,1%)
1998	78 (100%)	39 (100%)	139 (100%)	63 (100%)	27 (55,2%)	—	346 (90,3%)

3.3 – Prova de IDGA para pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA.

Para a pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA foi utilizado a prova de IDGA, de acordo com o procedimento descrito por COWAN & GRAVES (1966) e modificado por PINTO & HEDGER (1978). Em linhas gerais, placas de Petri de 85 mm de diâmetro foram preenchidas com 16 ml de ágar purificado (BACTOAGAR-DIFICO) a 1,5% em tampão TRIS 0,02M, contendo 0,15M de NaCl e azida sódica a 0,1% em pH 7,8. Após a solidificação do ágar, foram feitos 7 orifícios com o auxílio de um molde hexagonal. O orifício central, de 4 mm de diâmetro, foi preenchido com o antígeno VIA de referência obtido junto ao Centro Panamericano de Febre Aftosa e os 2 orifícios periféricos opostos, de 5mm de diâmetro, foram preenchidos com o soro de referência positivo, previamente titulado. Nos demais orifícios restantes periféricos, também de 5mm de diâmetro, foram colocados os soros a serem testados, de tal forma que cada soro teste foi adicionado a uma cavidade no gel localizada adjacente àquelas do soro de referência positivo. Após a colocação dos reagentes, as placas foram imediatamente colocadas em câmaras úmidas e incubadas à temperatura ambiente (aproximadamente 28°C). As leituras foram efetuadas em intervalos de 24 horas até o 7º dia, com o auxílio de um transiluminador. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações propostas por McVICAR & SUTMÖLLER (1970) e PINTO & GARLAND (1979). Segundo esses autores, o soro teste era considerado positivo quando ocorresse reação de identidade total visível entre ele e o soro controle positivo; o soro teste era considerado fracamente positivo se ocorresse reação na qual a linha de precipitação do soro controle positivo sofresse ligeira curvatura em direção ao soro teste e, negativo, quando o soro controle positivo fornecesse linha de precipitação “reta” ou seja, sem curvatura em direção ao soro teste.

3.4 – Imunoreagentes do teste BFL – ELISA.

3.4.1. Antígenos Virais

Foram utilizadas suspensões antigênicas inativadas com etileno-imina-binária (BEI)* de cada uma das 3 estirpes de referência do VFA, no caso O₁ Campos,

* As suspensões virais já inativadas com BEI das estirpes de referência vacinal O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial. foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Regional de Referência Animal do Ministério da Agricultura (LANARA - MA / Campinas - SP)

A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial. Tais estirpes virais, conforme informações do fornecedor*, foram, propagadas em cultura de células da linhagem BHK-21, clone 13. As suspensões resultantes foram clarificadas, através da adição de clorofórmio e de centrifugação a 2.000g e inativadas com BEI. Depois de distribuídas em alíquotas de 20ml cada uma, foram estocadas a -70°C, até o momento do uso.

A diluição ótima de reatividade da suspensão antigênica de cada uma dessas três estirpes, foi determinada pelo método do sandwich-ELISA, fazendo-se reagir várias diluições da suspensão antigênica (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) com a duas diluições do soro de captura (1:2000 e 1:4000) e, posteriormente com diferentes diluições do anti-soro detector (1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600), segundo protocolo de ARAÚJO Jr. (1994).

3.4.2. Purificação dos Antígenos 146S

A purificação dos antígenos 146S de cada uma das três estirpes do VFA O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial foi realizada através de ultracentrifugação em gradiente de sacarose, de acordo com a técnica de BROWN & CARTWRIGHT (1963). Em linhas gerais, cada uma das suspensões virais, cultivadas consoante descrito anteriormente, foi clarificada por meio de clorofórmio a 10% seguido de centrifugação a 3000g durante 10 minutos a 4°C e, posteriormente, concentrada através de precipitação com sulfato de amônio a 100% de saturação (v/v) tamponado com trihidroximetil amino metano em pó. Após o sedimento da precipitação com sulfato de amônio ter sido ressuspenso, através da adição de 20ml de PBS (0,14M NaCl, 0,01M PO₄⁻, pH 7.6), procedeu-se clarificação por meio de centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos.

Após tal procedimento, o sobrenadante obtido foi novamente submetido à ultracentrifugação a 95.000 x g por 4 horas, para sedimentação do antígeno 146S. O sedimento resultante, rico em antígenos 146S, foi ressuspenso em um volume de 3 ml do mesmo tampão acima descrito e, a seguir, colocado no topo de um gradiente contínuo de sacarose de 15 a 45% (p/p), o qual foi novamente ultracentrifugado a 95.000 x g durante 4 horas e trinta minutos, em rotor "swing-out", a fim de promover a separação do antígeno 146S dos demais componentes antigênicos virais, bem como das substâncias do meio de cultura celular, de acordo com o procedimento descrito por BARTELING & MELOEN (1974).

Por meio de uma bomba peristáltica e coletor de frações, foram colhidas frações do gradiente, de 1 ml cada, injetando-se vagarosamente sacarose a 55% no

fundo do tubo. A leitura espectrofotométrica de cada fração foi realizada em comprimento de onda de 260 nm (ARN) e 280 nm (proteína). Os antígenos foram quantificados pelo coeficiente de extinção 7,6 segundo BACHRACH et al. (1964). As frações contendo mais que 50 µg/ml de antígeno 146S foram reunidas em frasco único, e novamente mensuradas suas concentrações de RNA e de proteínas, sendo a seguir armazenadas em freezer a -70°C, até o momento de uso.

3.4.3. - Soros de Captura Anti-VFA Monoespecíficos

Foram produzidos segundo o protocolo de HAVE et al. (1984) através da inoculação, em coelhos, de duas doses de partículas 146S purificadas (50µg/dose) de cada uma das estirpes virais de referência misturadas aos adjuvantes completo (primeira dose) ou incompleto (segunda dose) de Freund. As doses foram administradas em intervalos de 4 semanas sendo os animais sangrados 10 dias após a última imunização, quando os soros foram separados, inativados a 56°C por 30 minutos, alicotizados e armazenados a -20°C até o momento do uso.

A diluição ótima de reatividade do anti-soro de captura foi determinada, por titulação em bloco, conforme já descrito (item 3.4.1). Para tanto, foram colocadas para reagir 2 diluições dos soros de captura (1:2000 e 1:4000) frente a diluições do antígeno viral homólogo (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) e, posteriormente frente a diferentes diluições do anti-soro detector de cobaias (1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600).

3.4.4 - Soros Detectores Anti-VFA Monoespecíficos

Foram preparados conforme recomendam FERRIS et al. (1984), em cobaias, através da inoculação de uma dose de partículas 146S (50µg) purificadas de cada uma das estirpes virais de referência, acrescidas de adjuvante completo de Freund, sendo os animais sangrados ao final de 4 semanas. Após essa primo-imunização o soro obtido foi inativados a 56°C por 30 minutos e depois de alicotizados, estocados a -20°C.

A diluição ótima de reatividade do antissoro detector foi determinada pelo método BFL-ELISA, consoante o que foi explanado no item 3.4.3; fazendo-se reagir diluições do antissoro detector (1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600) com 2 diluições do antissoro de captura (1:2000 e 1:4000) e as diluições do antígeno (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), conforme anteriormente descrito (item 3.4.3).

3.4.5. - Conjugado Imunoenzimático

A IgG de cobaio purificada por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (MONTASSIER et al., 1987) foi usada para imunizar 2 coelhos. A IgG de coelho anti-IgG de cobaio obtida após cromatografia em coluna de DEAE-celulose foi conjugada a peroxidase, segundo o método proposto por WILSON & NAKANE (1978). Para tal, 10 mg de peroxidase foram dissolvidas em 2,5 ml de água bidestilada, sob agitação magnética, durante 5 minutos, em frasco âmbar. Foi, então, adicionado à enzima dissolvida, 0,5 ml de uma solução de metaperiodato de sódio 0,1 M preparado em água bidestilada, um pouco antes de seu uso. Essa solução foi mantida sob agitação durante 20 minutos, à temperatura ambiente, para efetuar a oxidação da enzima. Em seguida, foi feita a dialisação dessa mistura em tampão acetato 0,001 M pH 4,4, "overnight" e em geladeira.

Para proceder a conjugação, foi colocado 2 ml de IgG de coelho anti IgG de cobaio na concentração de 10 mg/ml em um frasco âmbar à temperatura ambiente e, sob agitação, foi adicionado 30 µl de tampão carbonato bicarbonato 0,5 M pH 9,5 para alcalinização da imunoglobulina.

O mesmo procedimento foi realizado com a peroxidase oxidada a qual foi gotejada sobre a IgG alcalinizada, e mantida 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida, foi adicionado 125 µl de borhidreto de sódio 0,105 M, mantida a reação sob agitação ocasional durante 2 horas à 4°C e finalmente, dialisada contra PBS 0,01 M PO₄⁻⁻ 0,14 M NaCl pH 7,2, "overnight" à 4°C.

O conjugado foi submetido à cromatografia de gel de filtração em coluna de Sephadex G-100 de 1,6 cm de diâmetro e 67 cm de altura equilibrada com PBS 0,01 M PO₄⁻⁻ 0,14 M NaCl pH 7,2. O mesmo tampão foi utilizado para eluição e o fluxo foi padronizado em 10 gotas/minuto, colhendo-se frações de 1 ml cada. A leitura foi feita em 280 nm para detecção da proteína total e 403 nm para detecção da peroxidase. As frações com D.Os acima de 0,3 a 280 nm e de 0,2 a 403 nm foram recolhidas, misturadas, concentradas contra polietilenoglicol (PEG) 6000 e dialisada contra PBS pH 7,2. Por fim, foi adicionado um volume igual de glicerina tamponada com fosfato a pH 7,4. O conjugado foi distribuído em frascos contendo 1 ml cada e armazenado a - 20°C.

O conjugado foi então titulado através do método de ELISA direto frente a diferentes concentrações de IgG de cobaio, para determinação de sua diluição ótima de uso, conforme preconizam VOLLER et al. (1976).

3.4.6 - Técnica de BFL-ELISA

O método de BFL-ELISA, originalmente descrito por HAMBLIN et al. (1986) e com adaptações reportadas por ARAÚJO Jr. et al. (1996), foi empregado na detecção e quantificação de anticorpos presentes nos soros das diversas espécies animais aqui estudadas.

Numa primeira etapa, denominada de fase líquida do teste, todas as amostras de soro a serem analisadas foram acrescentadas, em duplicata, em uma diluição única, igual a 1:16, preparadas em tampão PBS 0,01 M PO_4^{--} 0,14 M NaCl pH 7,4 acrescido de Tween 20 a 0,05% e mais 10% de leite em pó desnatado (PBST-LPD). Para tanto, foi utilizada uma microplaca apropriada de fundo em "U" (CORNING), que não adsorve os imunocomplexos, a qual previamente foi bloqueada com 200 μl /cavidade, de PBS-LPD, durante 2 hs.

Em seguida, foi adicionada a diluição ideal de uma das suspensões virais de referência a cada um dos tipos do VFA (O_1 Campo, A_{24} Cruzeiro e C_3 Indaial) preparadas em tampão PBST, às cavidades da microplaca já contendo as diluições únicas dos soros teste. As cavidades das colunas 10, 11, e 12 das fileiras A a H, com exceção das cavidades G 12 e H 12 da microplaca (deixadas como branco da reação), foram reservadas respectivamente para funcionarem como controle dos antígenos, ou seja, para registrarem as densidades ópticas (D.Os) máximas da reação. A reação foi incubada "overnight" à 4°C, em câmara úmida. Ao mesmo tempo, 50 μl /cavidade da diluição ótima do antissoro de captura (anti-soro de coelho) monoespecífico anti-VFA foram adsorvidos em placas de fundo plano, (MAXSORP-NUNC), e incubadas da mesma maneira que a reação de fase líquida.

No dia seguinte, 50 μl /cavidade dos reagentes da fase líquida, contendo as misturas de vírus mais os soros a serem testados, foram transferidos para as microplacas de ELISA adsorvidas previamente com anti-soro de captura e bloqueadas com solução de 10% de leite em pó desnatado em tampão carbonato-bicarbonato (200 μl), sendo a reação incubada por 1 hora a 37°C.

Após incubação, a placa foi lavada 5 vezes com PBST, seguida da adição de 50 μl /cavidade do soro detector anti-VFA monoespecífico, preparado em cobaia. Seguiu-se novo período de incubação e lavagem, tal como se procedeu no passo anterior e, então, foi adicionado o conjugado, na sua diluição ótima de uso (1:1000), incubando-se a reação durante 60 minutos a 37°C. Procedeu-se, ao final dessa fase, a nova lavagem da placa e a adição da solução do substrato H_2O_2 a 30% mais cromógeno, ortofenilenodiamina (OPD), a qual foi preparada em tampão citrato-fosfato, sendo a incubação feita à temperatura ambiente por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 μl /cavidade de HCl a 2M. As D.Os foram lidas em leitor apropriado

para placas de ELISA (BIO-RAD MODELO-550), em um comprimento de onda de 492 nm contra o Branco da reação, sendo calculadas as percentagens de inibição conforme método recomendado por ARAÚJO Jr. et al. (1996), utilizando-se a fórmula:

$$PI = (1-x/y) \times 100$$

X = média das duplicatas das D. Os dos soros testes

Y = média das D. Os dos controles negativos da reação

Os soros que apresentaram resultado positivo no ensaio de diluição sérica única (1:16), isto é, percentagens de inibição maiores ou iguais a 50%, 60% e 42%, respectivamente para as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, foram, a seguir, testados no BFL-ELISA, em diluições seriadas de razão constante igual a 2, iniciando-se na diluição de 1:16.

A leitura dos resultados foi feita conforme já mencionado. Os títulos de anticorpos foram expressos como o logarítmo da recíproca da maior diluição do soro capaz de reduzir, em 50%, a média das D.Os registradas para os controles, e portanto de inibir o desenvolvimento da cor na reação imunoenzimática.

Para a determinação dos títulos, calculou-se, em primeiro lugar, a média aritmética das leituras das D.Os das cavidades do controle do antígeno. Em seguida, essa média foi dividida por 2 para determinar o valor correspondente a 50% dessa D.O. média. Depois, foram obtidos a média das duplicatas das D.Os dos soros testes imediatamente anterior e posterior a esse valor, observando suas respectivas diluições. Por fim, aplicou-se a fórmula:

$$T = \frac{([X-A] \log y) + ([B-X] \log z)}{B-A}$$

Onde:

X= Ponto representado por 50% da média aritmética das D.Os dos controles.

A= Média da D.O. imediatamente anterior a X.

B= Média da D.O. imediatamente posterior a X.

Y= Recíproca da diluição referente a D.O. imediatamente posterior a X.

Z= Recíproca da diluição referente a D.O. imediatamente anterior a X.

T= Título do soro teste referido como logarítmo da base 10.

Os títulos foram classificados nas faixas de: baixo (menor que 1,5), intermediário (entre 1,5 a 2,5) e elevado (maior que 2,5). As amostras que apresentaram título menor que 1,5 foram consideradas como resultados negativos.

4 – RESULTADOS

4.1 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA e contra as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial no teste BFL-ELISA.

Na Tabela 2, estão registrados os resultados das amostras positivas ao anti-antígeno VIA (Prova de IDGA), bem como frente as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, (Prova de BFL-ELISA), obtidos em soros de boi baguá, búfalo, carneiro, porco doméstico e porco do mato.

A análise dos resultados obtidos revelou 47 amostras (12,3%) reagentes ao antígeno VIA e 175 (45,7%), contendo anticorpos para uma ou mais das três estirpes (O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial) do VFA utilizadas no teste de BFL-ELISA (Figura 4). Todas as amostras soropositivas ao teste de IDGA também foram positivas ao teste de BFL-ELISA, sendo que 29/47 (61,7%) das amostras, positivas ao antígeno VIA, apresentaram, concomitantemente, anticorpos para as 3 estirpes de VFA, evento esse mais observado entre os bubalinos.

Nenhum cervídeo (veado campeiro, veado catingueiro e cervo do Pantanal) apresentou sorologia positiva nas provas de IDGA e BFL-ELISA.

Tabela 2: Resultados das amostras positivas nas espécies estudadas, em relação aos testes de IDGA e BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Espécies animais analisadas	Nº de amostras	IDGA		BFL-ELISA	
		Nº de positivos	%	Nº de positivos	%
Boi Baguá	78	25	32,1	54	69,2
Búfalo	39	17	43,6	31	79,5
Carneiro	139	02	1,4	58	41,7
Porco Doméstico	63	01	1,6	22	34,9
Porco do mato	49	02	4,1	10	20,4
Cervídeos	15	0	--	0	--
Total	383	47		175	

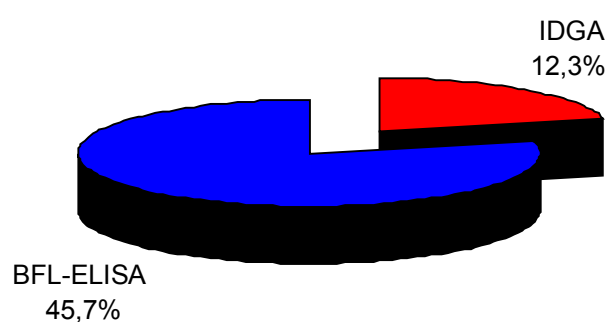


Figura 4: Percentagem de amostras positivas nas espécies estudadas de acordo com os resultados encontrados nos testes de IDGA e BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

4.2 – Resultados da análise das amostras positivas, segundo as provas de IDGA e BFL-ELISA, de acordo com a espécie animal.

4.2.1 - Boi baguá

Do total de 78 amostras de soros de boi baguá, todas colhidas no ano de 1998 e oriundas de um mesmo local (Fazenda "B"), 25 (32,1%) animais revelaram-se positivos no teste de IDGA e 54 (69,2%), no BFL-ELISA. Desse total de positivos no ensaio imunoenzimático, 29 (37,2%) apresentaram reatividade para a estirpe O₁ Campos, 33 (42,3%) para a estirpe A₂₄ Cruzeiro e 43 (55,1%) para a estirpe C₃ Indaial (Figura 5), sendo que 17 amostras apresentaram anticorpos para as três estirpes de VFA simultaneamente e dessas, 10, foram positivas também ao antígeno VIA.

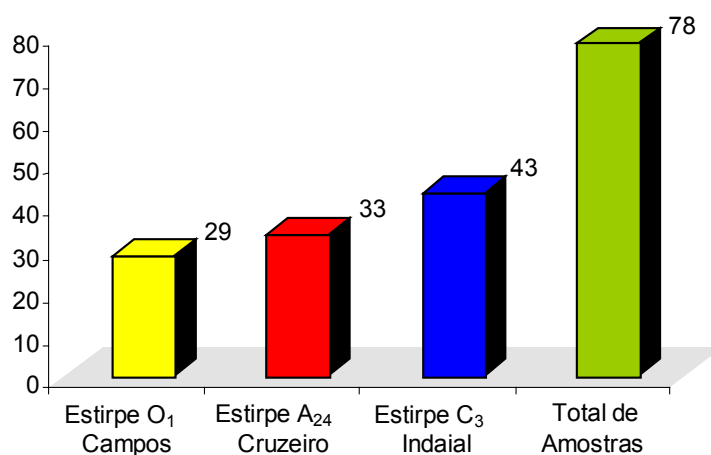


Figura 5: Amostras de soro de bovino baguá (*Bos taurus indicus* em estado feral) reagentes as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

A pesquisa de anticorpos anti-antígeno VIA nos bovinos baguás, revelou 5 (20,0%) animais de até 12 meses de idade; 12 (48,0%), entre 12 a 36 meses, e 8 (32,0%) animais com idade acima de 36 meses, reagentes. Já o teste de BFL-ELISA evidenciou 3 animais (10,3%) com idade até 12 meses; 12 (41,4%) entre 12 a 36 meses e 14 (48,3%) com mais de 36 meses, com títulos de anticorpos para a estirpe O₁ Campos. Anticorpos para a estirpe A₂₄ Cruzeiro foram detectados em 05 animais (15,2%) com idade até 12 meses; em 11 animais (33,3%) entre 12 a 36 meses e em 17 (51,5%) com idade superior a 36 meses. Na estirpe C₃ Indaial foram encontrados 07 animais (16,2%) com até 12 meses e 18 (41,9%) animais para ambas as faixas etárias entre 12 a 36 meses e acima de 36 meses de idade (Tabela 3).

Na titulação de anticorpos das amostras séricas positivas, os títulos de anticorpos foram expressos em logaritmo de base 10 e agrupados em três categorias: títulos inferiores a 1,5; entre 1,5 a 2,5 e superiores a 2,5 sendo considerados como títulos de baixa, média e alta magnitudes, respectivamente.

Frente a estirpe O₁ Campos, 12 animais apresentaram títulos inferiores a 1,5 sendo 2 animais com idade até 12 meses, 6 entre 12 a 36 meses e 4 acima de 36 meses. Dezesete animais tiveram títulos entre 1,5 a 2,5, sendo 1 com idade inferior a 12 meses, 6 com idade entre 12 a 36 meses e 10, acima de 36 meses. A média dos títulos encontrados para a faixa etária até 12 meses foi 1,47; em animais entre 12 a 36 meses, 1,54 e acima de 36 meses, 1,73. A média dos títulos encontrados para este sorotipo foi de 1,62 (Tabela 4).

Com relação a titulação de anticorpos contra a estirpe A₂₄ Cruzeiro, foram detectados 6 animais com títulos menores que 1,5, dos quais, 1 com idade até 12 meses e 5, com idade entre 12 a 36 meses. Os títulos compreendidos entre 1,5 a 2,5 totalizaram 27 animais sendo 4 com idade até 12 meses; 6, entre 12 a 36 meses e 17, acima de 36 meses. Não houve títulos maiores que 2,5 para as estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro. A média dos títulos encontrados para a faixa etária até 12 meses foi 1,68; em animais entre 12 a 36 meses, 1,61 e acima de 36 meses, 1,84. A média para essa estirpe viral foi de 1,74 (Tabela 4).

Já, no que diz respeito a estirpe C₃ Indaial, não foi detectado nenhuma amostra com título inferior a 1,5. Na faixa entre 1,5 a 2,5 foram encontrados 35 animais, sendo 5 com até 12 meses de idade; 12, em animais entre 12 a 36 meses, e 18 em animais acima de 36 meses. As amostras com títulos superiores a 2,5 resultaram em 8, sendo que, 2 em animais até 12 meses de idade e 6 entre 12 a 36 meses. A média dos títulos encontrados para a faixa etária até 12 meses foi 2,32; em animais entre 12 a 36 meses, 2,35 e acima de 36 meses, 2,07. A média resultante dos títulos obtidos para C₃ Indaial foi de 2,23 (Tabela 4).

Tabela 3: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em bovinos baguás (*Bos taurus indicus* em estado feral) segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

IDADE	IDGA		BFL-ELISA					
	Positivos	%	ESTIRPES VIRAIS					
			O ₁ Campos	%	A ₂₄ Cruzeiro	%	C ₃ Indaial	%
Até 12 meses	5	20,0	3	10,3	5	15,2	7	16,2
12 a 36 meses	12	48,0	12	41,4	11	33,3	18	41,9
Acima de 36 meses	8	32,0	14	48,3	17	51,5	18	41,9
TOTAL	25	100	29	100	33	100	43	100

Tabela 4: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em soros de bovinos baguás (*Bos taurus indicus* em estado feral), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Idade	ESTIRPE O ₁ CAMPOS			ESTIRPE A ₂₄ CRUZEIRO			ESTIRPE C ₃ INDAIAL		
	Título de anticorpos (log)			Título de anticorpos (log)			Título de anticorpos (log)		
	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Média/idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Média/idade	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/idade
Até 12m	2	1	1,47	1	4	1,68	5	2	2,32
12 a 36m	6	6	1,54	5	6	1,61	12	6	2,35
Acima de 36 meses	4	10	1,73	-	17	1,84	18	-	2,07
Total	12	17	-	6	27	-	35	8	-
Média /faixa de título	1,36	1,81	-	1,42	1,81	-	2,13	2,65	-
Média geral da estirpe	1,62			1,74			2,23		

4.2.2 - Búfalo

Das 39 amostras de soros de bubalinos, a prova de IDGA revelou 17 (43,6%) reagentes ao antígeno VIA, enquanto que o BFL-ELISA detectou 31 (79,5%), das quais, 23 (59,0%) com anticorpos para a estirpe O₁ Campos, 31 (79,5%) para a estirpe A₂₄ Cruzeiro e 17 (43,6%) para a estirpe C₃ Indaial (Figura 6). Cabe ressaltar que não há histórico de vacinação nestes animais em estudo, pelo menos, durante os 8 últimos anos.

Dezessete animais apresentaram anticorpos para as 3 estirpes virais concomitantemente e, destes, 16 também apresentaram anticorpos anti-antígeno VIA. Todas as amostras soropositivas ao tipo A₂₄ Cruzeiro, apresentaram, simultaneamente, anticorpos para as estirpes O₁ Campos e C₃ Indaial. Quatro (23,5%) e 13 (76,5%) amostras pertencentes a animais com menos de 12 meses e acima de 36, respectivamente, apresentaram reação ao antígeno VIA. Não houve amostra reativa em animais entre 12 a 36 meses (Tabela 5).

O BFL-ELISA detectou 4 (17,4%) amostras, provenientes de animais com até 12 meses de idade, 4 (17,4%) de animais entre 12 e 36 meses e 15 (65,2%) de animais com idade superior a 36 meses, com anticorpos para a estirpe O₁ Campos. Anticorpos para a estirpe A₂₄ Cruzeiro resultaram em 10 (32,3%) animais na faixa etária de até 12 meses de idade, em (16,1%) animais entre 12 e 36 meses e em 16 (51,6%) animais acima de 36 meses de idade. Em 3 (17,6%) animais com idade até 12 meses e em 14 (82,4%) com mais de 36 meses, foram encontrados anticorpos para a estirpe C₃ Indaial. Nenhum animal na faixa etária entre 12 a 36 meses foi positivo para esta estirpe (Tabela 5).

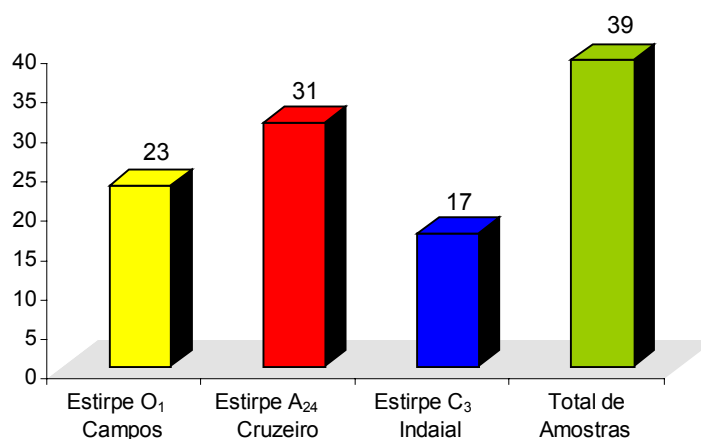


Figura 6: Amostras de soro de búfalo indiano (*Bubalus bubalis*) reagentes as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Tabela 5: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em búfalos indianos (*Bubalus bubalis*) segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

IDADE	IDGA		BFL-ELISA					
	Positivos	%	ESTIRPES VIRAIS					
			O ₁ Campos	%	A ₂₄ Cruzeiro	%	C ₃ Indaial	%
Até 12 meses	4	23,5	4	17,4	10	32,3	3	17,6
12 a 36 meses	-	-	4	17,4	5	16,1	-	-
Acima de 36 meses	13	76,5	15	65,2	16	51,6	14	82,4
TOTAL	17	100	23	100	31	100	17	100

Das 5 amostras colhidas na Fazenda "G", 3 (60,0%) apresentaram reação a uma das estirpes virais segundo o teste BFL-ELISA e nenhuma reagiu ao antígeno VIA. Na Fazenda "A", 17 (50,0%) e 28 (82,3%) do total de 34 soros colhidos, reagiram positivamente perante a prova de IDGA e ao teste BFL-ELISA, respectivamente.

A titulação de anticorpos das amostras de soros de bubalinos positivos no BFL-ELISA revelou, para a estirpe O₁ Campos, 1 animal de até 12 meses de idade e 3, entre 12 a 36 meses apresentando títulos menores que 1,5, totalizando 4 amostras. Na faixa de títulos entre 1,5 a 2,5 foram encontrados 12 animais sendo, 1 animal até 12 meses, 1, entre 12 a 36 e 10 acima de 36 meses. Já para os soros com títulos acima de 2,5, foram observados 7 amostras provenientes de 2 animais com idade até 12 meses e 5 acima de 36 meses. A média dos títulos encontrados para a faixa etária até 12 meses foi de 2,40; para amostras de animais entre 12 a 36 meses, 1,38 e acima de 36 meses, 2,32. A média dos títulos encontrados para esta estirpe viral foi 2,17 (Tabela 6).

Para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, foi encontrado somente 1 animal com idade acima de 36 meses com título menor que 1,5. Dezoito animais demonstraram títulos entre 1,5 a 2,5 sendo que, 7 possuíam idade até 12 meses, 4, entre 12 a 36 meses e 7 acima de 36 meses. Títulos maiores que 2,5 apresentaram 3 animais com até 12 meses, 1, com idade entre 12 a 36 e 8 acima de 36 meses, totalizando 12 amostras. A média dos títulos encontrados para animais na faixa etária até 12 meses foi de 2,43; entre 12 a 36 meses, 2,36 e acima de 36 meses de idade, 2,53. A média correspondente a essa estirpe foi de 2,47 (Tabela 6).

No que tange a estirpe C₃ Indaial, não foi encontrado animais com titulação menor que 1,5. Apenas 1 animal foi encontrado com título entre 1,5 a 2,5 e este possuía idade superior a 36 meses. Títulos superiores a 2,5 foram observados em 16 amostras, sendo em 3 animais na faixa etária de até 12 meses e em 13 animais, acima de 36 meses de idade. Títulos na faixa etária até 12 meses apresentaram 3,44 como média e para a faixa etária acima de 36 meses, 2,99. Não houve animais reagente na faixa de idade entre 12 a 36 meses. A média de títulos resultante para essa estirpe foi de 3,07 (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

ESTIRPE O ₁ CAMPOS					ESTIRPE A ₂₄ CRUZEIRO				ESTIRPE C ₃ INDAIAL			
<i>Título de anticorpo (log)</i>					<i>Título de anticorpo (log)</i>				<i>Título de anticorpo (log)</i>			
Idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/ idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/ idade	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/ idade	
Até 12m	1	1	2	2,40	-	7	3	2,43	-	3	3,44	
12 a 36m	3	1	-	1,38	-	4	1	2,36	-	-	-	
Acima de 36 meses	-	10	5	2,32	1	7	8	2,53	1	13	2,99	
Total	4	12	7	-	1	18	12	-	1	16	-	
Média/faixa de título	1,33	2,08	2,82		1,50	2,26	2,87		2,45	3,11		
Média geral da estirpe		2,17				2,47				3,07		

4.2.3 - Carneiro

Do total de 139 amostras de soros de carneiro analisadas, somente 2 foram reagentes ao antígeno VIA, enquanto que 58 amostras foram positivas ao teste de BFL-ELISA detectou. Em síntese, os resultados da pesquisa de anticorpos através da técnica de BFL-ELISA revelaram 54 (38,8%), 53 (38,1%) e 45 (32,4%), das amostras de soros, positivas para as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, respectivamente (Figura 7). Não houve amostras com presença de anticorpo somente para as estirpes O₁ Campos e C₃ Indaial. Quarenta soros apresentaram anticorpos para as 3 estirpes virais simultaneamente.

A análise das amostras positivas de carneiros, quanto a idade, revelou a presença de 3 (5,5%) animais de até 3 meses de idade, de 9 (16,7%) animais entre 3 a 12 meses e de 42 (77,8%) com idade superior a 12 meses contendo anticorpos para a estirpe O₁ Campos. No caso da estirpe A₂₄ Cruzeiro, em 3 (5,7%), 4 (7,5%) e 46 (86,8%) animais foram detectados anticorpos, respectivamente nas faixas etárias até 3 meses, entre 3 a 12 meses e acima de 12 meses. Já para a estirpe C₃ Indaial, foram identificados 2 (4,4%) soros positivos em animais com até 3 meses de idade, 9 (20,0%) entre 3 a 12 meses e 34 (75,6%) em indivíduos com mais de 12 meses. Os únicos 2 animais positivos no teste de IDGA possuíam mais de 12 meses de idade (Tabela 7).

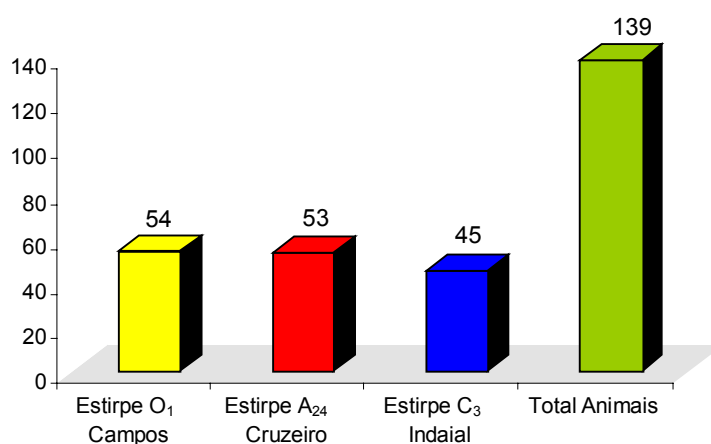


Figura 7: Amostras de soro de carneiro (*Ovis aries*) reagentes as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Tabela 7: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em carneiro (*Ovis aries*), segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

IDADE	IDGA		BFL-ELISA					
	Positivos	%	O ₁ Campos	%	A ₂₄ Cruzeiro	%	C ₃ Indaial	%
Até 3 meses	-	--	3	5,5	3	5,7	2	4,4
3 a 12 meses	-	--	9	16,7	4	7,5	9	20,0
Acima de 12 meses	2	100	42	77,8	46	86,8	34	75,6
TOTAL	2	100	54	100	53	100	45	100

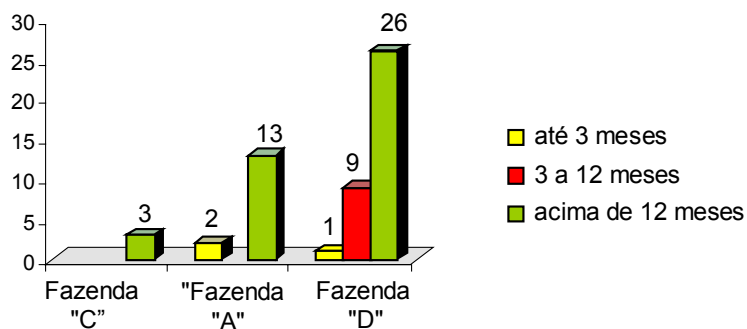
Segundo os resultados do teste BFL-ELISA, a ocorrência das 3 estirpes de VFA nas diferentes propriedades estudadas, revelou para a estirpe O₁ Campos, 3 amostras positivas na Fazenda "C", todas em animais acima de 12 meses. Quinze amostras soropositivas foram encontradas na Fazenda "A", sendo que, 2 eram animais até 3 meses e 13, em animais acima de 12 meses. Na Fazenda "D" foram reveladas 36 amostras contendo anticorpos para a estirpe acima citada, sendo 1 amostra pertencente a um animal até 3 meses, 9, em animais entre 3 a 12 meses e 26, acima de 12 meses de idade. Não foram encontrados animais soropositivos na Fazenda "F" (Figura 8).

Para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, 1 e 5 amostras oriundas de animais acima de 12 meses, foram reveladas nas Fazendas "F" e "C", respectivamente. Na Fazenda "A", houveram 16 amostras soropositivas sendo 2 em animais até 3 meses e 14, acima de 12 meses de idade. Já a Fazenda "D", totalizou 31 amostras contempladas da seguinte forma: 1, de animal até 3 meses de idade, 4, de animais entre 3 a 12 meses e 26, de animais acima de 12 meses (Figura 8).

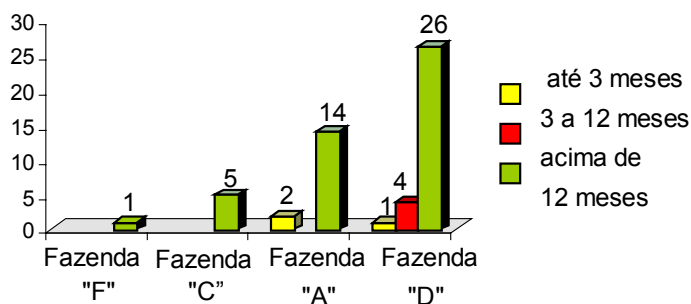
A estirpe C₃ Indaial, demonstrou 9 animais apresentando anticorpos na Fazenda "A" sendo 1 com até 3 meses e 8 acima de 12 meses de idade. Na Fazenda "D" foram demonstrados 1 animal até 3 meses, 9, entre 3 e 12 meses e 26 acima de 12 meses de idade totalizando 36 amostras soropositivas. Não foram encontradas amostras positivas nas Fazendas "C" e "F" (Figura 8).

De acordo com o teste de IDGA, 1 soro reagente pertencia a um animal da Fazenda "A" e o outro soro, da Fazenda "D".

ESTIRPE O₁ CAMPOS



ESTIRPE A₂₄ CRUZEIRO



ESTIRPE C₃ INDAIAL

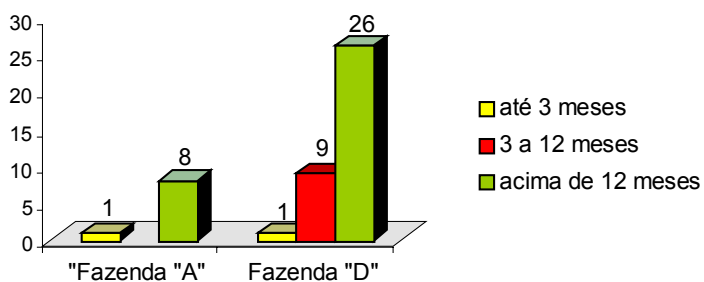


Figura 8: Amostras soropositivas de carneiro (*Ovis aries*) de acordo com os resultados do teste BFL-ELISA nos diferentes locais de colheita do material sanguíneo segundo distribuição por faixa etária.

A análise por diluições seriadas, das amostras de soros positivas no BFL-ELISA, revelou para a estirpe O₁ Campos, 3 animais com título menor que 1,5, sendo que 2 possuíam 3 a 12 meses de idade e 1, com idade acima de 12 meses. Na faixa de títulos entre 1,5 a 2,5 foram detectados 20 soros, sendo 2 originados de animais com até 3 meses de idade, 5, entre 3 a 12 meses e 13 com mais de 12 meses de idade. Com respeito aos títulos superiores a 2,5 foram encontradas 31 amostras, sendo 1 proveniente de animal com até 3 meses de idade, 2, de animais entre 3 a 12 meses e 28 de animais com mais de 12 meses. A média resultante dos títulos encontrados para animais na faixa etária até 3 meses foi de 2,16; para animais na faixa entre 3 a 12 meses, 2,20 e acima de 12 meses, 2,62. A média geral dos títulos encontrados nesta estirpe foi de 2,52 (Tabela 8).

Para estirpe A₂₄ Cruzeiro, nenhuma amostra apresentou título menor que 1,5. Um animal, com até 3 meses de idade, 1, de 3 a 12 meses e 12 com mais de 12 meses de idade apresentaram títulos entre 1,5 a 2,5, totalizando 14 amostras. Títulos superiores a 2,5 foram observados em 39 amostras distribuídas da seguinte forma: 2 animais com até 3 meses, 3 amostras de animais entre 3 a 12 meses e 34 com idade maior que 12 meses. A média dos títulos encontrados para a faixa etária até 3 meses, foi de 2,52; para a faixa de idade entre 3 a 12 meses, 2,74 e acima de 12 meses, 2,79. A média dos títulos resultantes para essa estirpe viral foi 2,77 (Tabela 8).

Títulos de anticorpos para a estirpe C₃ Indaial, menores que 1,5 também não foram encontrados. Títulos compreendidos na faixa entre 1,5 a 2,5 foram observados em 1 animal, com menos de 3 meses, 3, entre 3 a 12 meses e 6 com idade superior a 12 meses, totalizando 10 animais. Títulos superiores a 2,5, foram encontrados em 35 amostras sendo que, 1 pertencia a um animal com até 3 meses, 6, entre 3 a 12 meses e 28 com mais de 12 meses de idade. A média dos títulos encontrados em animais com até 3 meses, foi de 2,45; entre 3 a 12 meses, 2,59 e acima de 12 meses, 3,12. A média dos títulos encontrada nessa estirpe foi de 2,98 (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em soros de carneiro (*Ovis aries*), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

ESTIRPE O ₁ CAMPOS					ESTIRPE A ₂₄ CRUZEIRO			ESTIRPE C ₃ INDAIAL		
<i>Título de anticorpos (log)</i>					<i>Título de anticorpos (log)</i>			<i>Título de anticorpos (log)</i>		
Idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/idade	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/idade	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/idade
Até 3 meses	-	2	1	2,16	1	2	2,52	1	1	2,45
3 a 12 meses	2	5	2	2,20	1	3	2,74	3	6	2,59
Acima de 12 meses	1	13	28	2,62	12	34	2,79	6	28	3,12
Total	3	20	31	-	14	39	-	10	35	-
Média/faixa de título	1,47	1,92	3,01		1,98	3,06		2,10	3,24	
Média geral da estirpe		2,52				2,77			2,98	

A análise de diluições seriadas, das amostras de soros positivas no BFL-ELISA de acordo com os diferentes locais de colheita, revelou para a estirpe O₁ Campos, para títulos menores que 1,5, 1 animal na Fazenda "A" e 2, na Fazenda "B". Títulos na faixa de 1,5 a 2,5 apresentaram 3 amostras na Fazenda "C", 10, na Fazenda "A" e 7, na Fazenda "D". Títulos superiores a 2,5, revelaram 4 animais na Fazenda "A" e 27 na Fazenda "D". Para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, nenhuma Fazenda demonstrou amostras com títulos inferiores a 1,5. Na Fazenda "F" foram encontradas 1, na Fazenda "C", 5, na Fazenda "A", 7 e na Fazenda "D", 1 amostra com títulos entre 1,5 a 2,5. Nove e 30 animais nas Fazendas "A" e "D" apresentaram títulos acima de 2,5, respectivamente. A estirpe C₃ Indaial foi encontrada somente nas Fazendas "A" e "D" compreendendo 6 e 4 animais com títulos entre 1,5 a 2,5 e 3 e 32 animais com títulos superiores a 2,5, respectivamente, como demonstra a Tabela 9.

Tabela 9: Número de amostras positivas e média dos títulos de anticorpos anti-estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em soros de carneiro (*Ovis aries*), de acordo com os diferentes locais de colheita, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Estirpe O ₁ Campos	FAZENDA F		FAZENDA C		FAZENDA A		FAZENDA D	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação								
< 1,5	-		-		1	1,38	2	1,51
1,5 a 2,5	-		3	1,65	10	1,77	7	2,24
> 2,5	-		-		4	2,73	27	3,05

Estirpe A ₂₄ Cruzeiro	FAZENDA F		FAZENDA C		FAZENDA A		FAZENDA D	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação								
< 1,5	-		-		-		-	
1,5 a 2,5	1	1,78	5	1,90	7	1,98	1	2,46
> 2,5	-		-		9	2,86	30	3,11

Estirpe C ₃ Indaial	FAZENDA F		FAZENDA C		FAZENDA A		FAZENDA D	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação								
< 1,5	-		-		-		-	
1,5 a 2,5	-		-		6	2,03	4	2,19
> 2,5	-		-		3	2,82	32	3,27

4.2.4 - Porco doméstico

Os resultados dos estudos realizados em porcos domésticos revelaram, das 63 amostras colhidas, 1 (1,6%) animal reagente positivo ao antígeno VIA (IDGA) e 22 (34,9%) contendo anticorpos para 2 das 3 estirpes virais utilizadas no teste de BFL-ELISA. Foram identificados 7 (11,1%) amostras de soros com anticorpos para a estirpe O₁ Campos e 22 (35,0%) amostras com anticorpos para a estirpe A₂₄ Cruzeiro. Não foi encontrado nenhum soro com anticorpos para a estirpe C₃ Indaial (Figura 9). Os 7 animais soropositivos ao sorotipo O₁ Campos, também foram reagentes ao A₂₄ Cruzeiro.

A análise dos soros que resultaram positivos, demonstrou que o único soro reagente no teste de IDGA pertencia a um animal acima de 7 meses de idade. No teste de BFL-ELISA, 1 animal, entre 2 a 7 meses de idade, e 6, com mais de 7 meses, apresentaram anticorpos frente a estirpe O₁ Campos. No tocante à estirpe A₂₄ Cruzeiro, em 5 e em 17 animais, nas faixas etárias entre 2 a 7 meses e acima de 7 meses, respectivamente, foram detectados anticorpos para essa estirpe viral. Em nenhum animal com até 2 meses de idade, foram encontrados anticorpos para as estirpes de VFA utilizadas no teste de BFL-ELISA (Tabela 10).

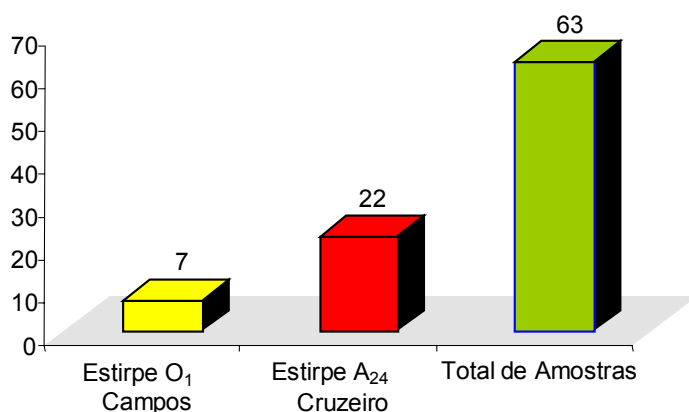


Figura 9: Amostras de soro de porco doméstico (*Sus scrofa*) reagentes as estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro segundo o teste BFL-ELISA, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Tabela 10: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro de acordo com o teste BFL-ELISA, em porco doméstico (*Sus scrofa*), segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

IDADE	IDGA		BFL-ELISA ESTIRPES VIRAIS			
	Positivos	%	O ₁ Campos	%	A ₂₄ Cruzeiro	%
2 a 7 meses	-	-	1	14,3	5	22,7
Acima de 7 meses	1	100	6	85,7	17	77,3
TOTAL	1	100	7	100	22	100

A única amostra reagente no teste de IDGA, foi proveniente de um animal da Fazenda "B". Já, de acordo com os resultados do BFL-ELISA, 9 amostras soropositivas, foram originadas de animais da Fazenda "A" e 13, da Fazenda "B", conforme a Figura 10. Todas as amostras que reagiram ao tipo O₁ Campos, em ambas as fazendas, reagiram ao tipo A₂₄ Cruzeiro do vírus VFA.

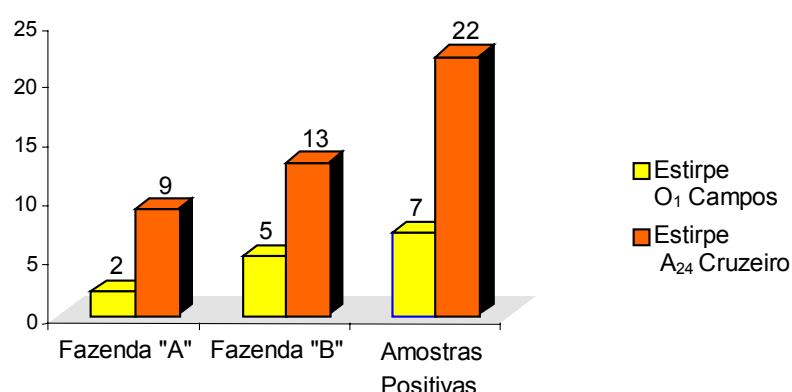


Figura 10: Amostras soropositivas de porco doméstico (*Sus scrofa*) segundo os resultados do teste BFL-ELISA, nos diferentes locais de colheita do material sanguíneo.

A análise dos resultados por diluição seriada dos soros, de acordo com a idade do animal, revelou como positivo, 1 indivíduo entre 2 a 7 meses e 3, com mais de 7 meses de idade os quais apresentaram títulos menores que 1,5, totalizando 4 amostras. Na faixa de titulação entre 1,5 a 2,5, somente foram encontrados 2 animais e ambos com mais de 7 meses de idade, para a estirpe O₁ Campos. Não foi encontrado títulos superiores a 2,5. A média de títulos para animais entre 2 a 7 meses foi de 1,43 e em amostras de indivíduos com idade superior a 7 meses, 1,42. A média para essa estirpe foi 1,42 (Tabela 11).

Para o tipo A₂₄ Cruzeiro do VFA, foi identificada 1 amostra reativa em um animal com mais de 7 meses. Títulos entre 1,5 a 2,5 foram demonstrados em 14 amostras sendo 4 em animais na faixa etária entre 2 a 7 meses e 10, em animais maiores do que 7 meses. Na faixa de títulos maiores que 2,5, 1 e 6 soros, respectivamente, demonstraram títulos em animais de 2 a 7 meses e superiores a 7 meses de idade. A média dos títulos encontrados para a faixa etária entre 2 a 7 meses foi 2,20 e com mais de 7 meses, 2,30. A média geral da estirpe A₂₄ Cruzeiro foi 2,28 (Tabela 11).

Tabela 11: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro, em soros de porco doméstico (*Sus scrofa*), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

ESTIRPE O ₁ CAMPOS				ESTIRPE A ₂₄ CRUZEIRO			
<i>Título de anticorpos (log)</i>				<i>Título de anticorpos (log)</i>			
Idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Média/idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/idade
2 a 7 meses	1	-	1,43	-	4	1	2,20
Acima de 7 meses	4	2	1,38	1	10	6	2,30
Total	5	2	-	1	14	7	-
Média/faixa de título	1,34	1,60		1,47	2,13	2,68	
Média geral da estirpe		1,39			2,28		

A titulação das amostras positivas levando em consideração o local de colheita dos soros demonstrou, para o vírus tipo O₁ Campos, 1 amostra reagente com título menor que 1,5 na Fazenda "A". Na Fazenda "B", ocorreram 3 amostras com título menor que 1,5 e 2 na faixa de titulação entre 1,5 e 2,5. Para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, na Fazenda "A", foram detectadas 1, 7 e 1 amostra para títulos menores que 1,5, entre 1,5 e 2,5 e superiores a 2,5, respectivamente. Na Fazenda "B", foram revelados 7 soros com título entre 1,5 e 2,5 e 6 amostras com títulos maiores que 2,5 (Tabela 12).

Tabela 12: Número de amostras positivas e média dos títulos de anticorpos anti-estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro, em soros de porco doméstico (*Sus scrofa*), de acordo com os diferentes locais de colheita, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Estirpe O ₁ Campos	FAZENDA A		FAZENDA B	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação				
< 1,5	2	1,21	3	1,37
1,5 a 2,5	-	-	2	1,60
> 2,5	-	-	-	-

Estirpe A ₂₄ Cruzeiro	FAZENDA A		FAZENDA B	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação				
< 1,5	1	1,47	-	-
1,5 a 2,5	7	2,20	7	2,10
> 2,5	1	2,53	6	2,70

4.2.5 – Porco do mato

Os resultados da análise sorológica, realizada em 49 amostras colhidas de porco do mato, revelaram 2 amostras de soros reagentes positivo ao antígeno VIA na prova de IDGA, e 3 (6,1%), 9 (18,4%) e 1 (2,0%) amostras, contendo anticorpos para as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, respectivamente, no teste de BFL-ELISA, totalizando 10 amostras positivas (Figura 11).

A análise dos animais amostrados, quanto a idade, revelou a não existência de soro positivo na faixa etária abaixo de 2 meses de idade, nos dois testes laboratoriais efetuados (IDGA e BFL-ELISA). Na prova de IDGA, as 2 amostras positivas ocorreram em animais com idade superior a 7 meses. No BFL-ELISA, 3 soros de animais com mais de 7 meses, apresentaram anticorpos para a estirpe O₁ Campos. Já, para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, foram identificadas 1 amostra com anticorpo em animal na faixa etária entre 2 a 7 meses, e 8 amostras provenientes de animais com idade superior a 7 meses. Em somente 1 amostra, proveniente de um animal com mais de 7 meses de idade, foi detectado anticorpo para estirpe C₃ Indaial (Tabela 13).

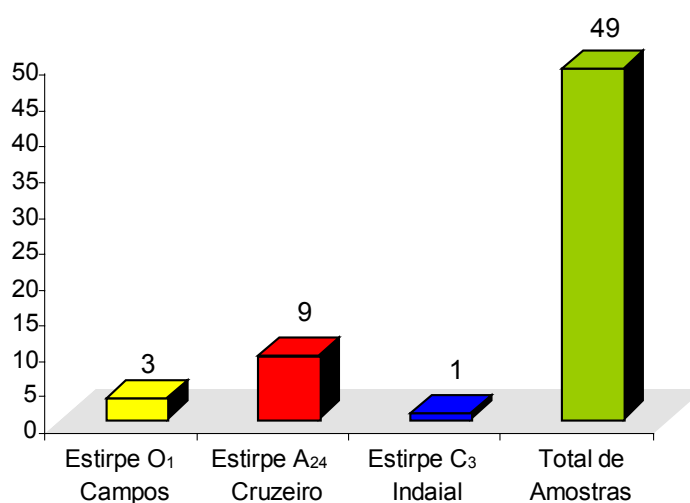


Figura 11: Amostras de soro de porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral) reagentes as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial segundo o teste BFL-ELISA, Nhicolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Tabela 13: Percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA (IDGA) e as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial de acordo com o teste BFL-ELISA, em porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral) segundo distribuição por faixa etária, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

IDADE	IDGA		BFL-ELISA					
	Positivos	%	O ₁ Campos	%	A ₂₄ Cruzeiro	%	C ₃ Indaial	%
2 a 7 meses	-	-	-	-	1	11,1	-	-
Acima de 7 meses	2	100	3	100	8	88,9	1	100
TOTAL	2	100	3	100	9	100	1	100

Analizando as amostras reagentes, de acordo com o ano de colheita, não foi encontrado soro positivo no ano de 1994. No ano de 1996, somente foram detectados anticorpos para a estirpe A₂₄ Cruzeiro em 4 amostras oriundas de animais da Fazenda "A". No ano de 1998, 9 amostras demonstraram anticorpos contra antígenos do VFA em soros oriundos da fazenda "E", sendo que desse total, foram detectados anticorpos para a estirpe O₁ Campos em 3 animais, para a estirpe A₂₄ Cruzeiro em 5 animais, e para a estirpe C₃ Indaial, em 1 animal (Figura 12).

Os resultados do BFL-ELISA com diluição seriada das amostras séricas que apresentaram reação positiva, demonstraram títulos menores que 1,5 e entre 1,5 a 2,5, respectivamente, em 2 e 1 amostras de soros para a estirpe O₁ Campos sendo que todos eram animais com idade superior a 7 meses. Não houve amostras com títulos superiores a 2,5. A média para os títulos encontrados em animais nessa faixa etária foi de 1,37. A média geral para essa estirpe foi de 1,37 (Tabela 14).

Para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, não houve amostras com títulos inferiores a 1,5. Na faixa de títulos entre 1,5 a 2,5, foram detectados 6 soros, sendo que, 1, pertencente a um animal de 2 a 7 meses e 5, a animais com idade superior a 7 meses. Três amostras de soros de animais com mais de 7 meses de idade revelaram títulos superiores a 2,5. O valor médio dos títulos encontrados para a faixa de idade entre 2 a 7 meses foi 2,32 e a média dos títulos para idade superior a 7 meses foi de 2,38. A média da titulação para essa estirpe foi de 2,38 (Tabela 14). Um único animal apresentou anticorpo para a estirpe C₃ Indaial, com título entre 1,5 a 2,5 e sua idade era superior a 7 meses. O valor do título encontrado foi 1,82 (Tabela 14).

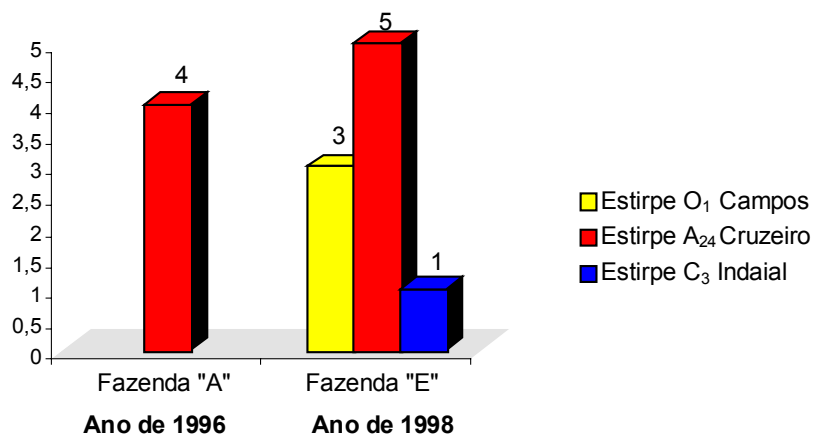


Figura 12: Amostras soropositivas de porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral) segundo os resultados do teste BFL-ELISA, de acordo com o ano e local de colheita do material sanguíneo.

Tabela 14: Distribuição dos títulos de anticorpos obtidos no BFL-ELISA contra as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em soros de porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral), de acordo com as diferentes faixas etárias, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

	ESTIRPE O ₁ CAMPOS			ESTIRPE A ₂₄ CRUZEIRO			ESTIRPE C ₃ INDAIAL	
	Título de anticorpos (log)			Título de anticorpos (log)			Título de anticorpos (log)	
Idade	Menor de 1,5	1,5 a 2,5	Média/idade	1,5 a 2,5	Maior de 2,5	Média/idade	1,5 a 2,5	Média/idade
2 a 7 meses	-	-	-	1	-	2,32	-	-
Acima de 7 meses	2	1	1,37	5	3	2,38	1	1,82
Total	2	1	-	6	3	-	1	-
Média/faixa de título	1,30	1,51		2,22	2,70		1,82	
Média geral da estirpe		1,37			2,38		1,82	

A análise de diluições seriadas das amostras de soros positivos, de acordo com os diferentes locais de colheita, revelou para a estirpe O₁ Campos, 2 amostras cujos títulos foram inferiores a 1,5 e 1 para a faixa entre 1,5 a 2,5, todas originadas da Fazenda "E". A estirpe A₂₄ Cruzeiro, demonstrou 4 amostras com título entre 1,5 a 2,5, procedentes da Fazenda "A". Na Fazenda "E", foram encontrados 2 e 3 soros com titulação entre 1,5 e 2,5 e maior que 2,5, respectivamente. O único animal reagente a estirpe C₃ Indaial possuía título entre 1,5 e 2,5 e foi capturado na Fazenda "E" (Tabela 15).

Tabela 15: Número de amostras positivas e média dos títulos de anticorpos anti-estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, em soros de porco do mato (*Sus scrofa* em estado feral), de acordo com os diferentes locais de colheita, Nhecolândia, Pantanal sulmatogrossense, 1998.

Estirpe O ₁ Campos	FAZENDA A		FAZENDA E	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação				
< 1,5	-	-	2	1,30
1,5 a 2,5	-	-	1	1,51
> 2,5	-	-	-	-

Estirpe A ₂₄ Cruzeiro	FAZENDA A		FAZENDA E	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação				
< 1,5	-	-	-	-
1,5 a 2,5	4	2,21	2	2,24
> 2,5	-	-	3	2,70

Estirpe C ₃ Indaial	FAZENDA A		FAZENDA E	
	Amostras positivas	Média	Amostras positivas	Média
Titulação				
< 1,5	-	-	-	-
1,5 a 2,5	-	-	1	1,82
> 2,5	-	-	-	-

5 - DISCUSSÃO

No presente estudo, soros colhidos de diferentes espécies de animais silvestres e domésticas susceptíveis e não vacinadas contra o vírus da febre aftosa (VFA), em fazendas localizadas na sub-região de Nhecolândia, no Pantanal de Mato Grosso do Sul, revelaram a presença de anticorpos anti-antígeno VIA e de anticorpos tipo específico para as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, mediante as provas de IDGA e BFL-ELISA, respectivamente.

Analisando os dados inseridos na Tabela 2 verifica-se, no que concerne à detecção de anticorpos anti-antígeno VIA, 25 (32,1%) de 78 soros amostrados de bovino baguá, 17 (43,6%) de 39 soros de búfalo, 02 (1,4%) de 139 soros de carneiro, 01 (1,6%) de 63 amostras de porco doméstico, 02 (4,1%) de 49 soros de porco do mato, continham anticorpos contra o referido antígeno. Em relação aos resultados da pesquisa de anticorpos tipo específicos, observou-se que 54 (69,2%) amostras de soro de boi baguá, 31 (79,5%) de búfalo indiano, 58 (41,7%) de carneiro, 22 (34,9%) de porco doméstico e 10 (20,4%) de porco do mato possuíam anticorpos para, pelo menos, uma das três estirpes padrões do VFA utilizadas na prova de BFL-ELISA.

A análise geral desses dados sugere que, no período da colheita de amostras ou anterior a este, houve atividade de infecção pelo VFA na região amostrada. Tal fato é atestado pela presença significativa de animais reagentes positivos às provas de IDGA e BFL-ELISA. Somente nos cervídeos, não foi encontrado nenhuma amostra soropositiva de acordo com os testes utilizados. Esse resultado assemelha-se ao observado por LAWMAN et al. (1978) na Inglaterra, entretanto, entretanto, ARAÚJO Jr. & DUARTE (2000) encontraram 37/117 cervos do pantanal, soropositivos na região da Usina Hidroelétrica de Porto Primavera/SP. CHRISTIENSEN (1939) citado por MACAULAY (1963), revisou toda a literatura européia e concluiu que

os cervídeos eram raramente afetados pela FA e poderiam ter pouca importância na epidemiologia da doença.

Em adição, o presente trabalho se reveste de importância ainda maior pelo seu caráter inédito, já que se constitui na primeira avaliação sorológica realizada no Pantanal sulmatogrossense sobre a pesquisa de anticorpos contra o VFA em espécies domésticas e silvestres não vacinadas e, tampouco submetidas aos procedimentos usuais de manejo.

A demonstração da ocorrência dos três sorotipos de vírus em bois baguás, confirmam os resultados encontrados por MATHIAS et al. (1981), na região da Nhecolândia.

O número de bovinos baguás positivos, bem como a média geral dos títulos detectados no BFL-ELISA, foi maior para a estirpe C₃ Indaial do VFA (Figura 5/Tabela 4). Ao contrário, MATHIAS et al. (1981) verificaram para a região da Nhecolândia a predominância de animais reagentes positivos para o subtipo O₁ Campos. Embora passados 13 anos, esses resultados corroboraram com os dados encontrados nos focos de FA ocorridos em 1994, na região da Nhecolândia, e em 1998 e 1999 em Porto Murtinho e Naviraí, os quais se constituem nos últimos relatos da doença no Estado de Mato Grosso do Sul onde também foram isolados vírus pertencente ao subtipo "O₁" do VFA conforme registrado no Boletim de Ocorrência de FA nº 4861 e nos relatórios do DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO DO SUL (1998, 2000 (no prelo)).

Deve-se levar em conta a possibilidade de, nos casos específicos dos bovinos baguás e bubalinos com mais idade, a especificidade e título dos anticorpos anti-VFA encontrados, ter sido em consequência de um episódio de infecção que tenha ocorrido em um período distante à data de colheita das amostras de soros desses animais. Pode-se supor que indivíduos mais velhos tenham passado por mais de uma infecção provocada por diferentes estirpes do VFA, havendo nesse caso o estímulo de resposta imune de memória. Isso explicaria a não predominância de um perfil de reatividade sorológica mais específica e distinta capaz de identificar o tipo de vírus que efetivamente estava circulando no campo na ocasião em que as amostras de soro foram obtidas.

Em bubalinos, na primeira etapa da análise sorológica, quando foi feita uma triagem das amostras, houve maior número de soros com presença de anticorpos contra a estirpe A₂₄ Cruzeiro do VFA, detectados pelo teste BFL-ELISA (Figura 6). Entretanto, na fase posterior de titulação de anticorpos por essa mesma técnica, o valor médio dos títulos encontrados, foi maior para a estirpe C₃ Indaial (Tabela 6).

Os títulos mais elevados de anticorpos em bovinos baguás e búfalos para a estirpe C₃ Indaial do VFA é intrigante, tendo em vista que esse tipo de vírus, sobretudo nas décadas de 60 e 80, quando a doença ainda ocorria de forma endêmica no país, sempre apresentou ocorrência de isolamento baixa em relação aos tipos "O" e "A", sejam em casos espontâneos da enfermidade (CASTRO, M. P. et al., 1967; PUSTIGLIONE NETTO et al., 1974; KOTAIT et al., 1979; PASSOS et al., 1990/1994) ou de animais em estado de portador (JEREZ et al., 1979). Contudo, um trabalho de rotina sistemático e contínuo envolvendo o isolamento e a tipificação de VFA de casos espontâneos da doença no campo, foi desenvolvido desde 1963, por técnicos do Instituto Biológico demonstrando a ocorrência da FA no Estado de São Paulo. Ficou demonstrado nesses estudos, a predominância de um determinado tipo de vírus sobre o outro, dependendo das condições epidemiológicas da região estudada (PUSTIGLIONE NETTO et al., 1969; ANGELI et al., 1985). Esses trabalhos, demonstraram que o tipo "O" parecia ocorrer de maneira cíclica a cada quatro anos; o tipo "A" se caracterizava pela ocorrência de focos limitados provocados por estirpes variantes, e o tipo "C" era de ocorrência ocasional (PUSTIGLIONE NETTO et al., 1974; KOTAIT et al., 1979). Com o advento das vacinações maciças obrigatórias e o controle da FA no campo, o vírus do tipo "C" não tem sido mais isolado. Contudo, diante dos resultados obtidos, não se pode descartar em definitivo a circulação de vírus do tipo "C" entre os bovinos e bubalinos estudados, uma vez que há animais que só apresentaram títulos médios ou elevados de anticorpos contra essa estirpe viral, concomitantemente com títulos muito reduzidos ou ausentes de anticorpos contra as estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro.

A detecção de anticorpos para o VFA nos bovinos baguás e búfalos amostrados sem que esses animais houvessem sido vacinados e até mesmo sem terem apresentado sintomas da doença, vem de encontro aos dados relatados por SUTMÖLLER & GAGGERO, (1965); SUTMÖLLER et al., (1968); HEDGER et al., (1969); HYSLOP (1970); CONDY & HEDGER, (1974); HEDGER, (1976); PINTO & HEDGER, (1978); JEREZ et al., (1979); SAMARA & PINTO, (1983); ESTERHUYSEN et al. (1985); ANDERSON (1986); BENGIS et al. (1986); SAMARA et al., (1987); PASTORET et al. (1988); ANDERSON et al. (1993); DAWE et al., (1994a) e DAWE et al., (1994b), que demonstraram nessas espécies, a manutenção do vírus por longo período de tempo, na condição de portador assintomático, com a produção de níveis séricos elevados de anticorpos.

Conforme demonstrado por PINTO & GARLAND, (1979), anticorpos anti-antígeno VIA podem ou não se desenvolver após repetidas vacinações, mas a frequência e duração dessas respostas é sempre fugaz, ou seja, ao redor de 30 a 40 dias após a última vacinação, o que não é o caso dos animais envolvidos na presente

investigação. Esse fato sugere que a atividade de infecção pelo VFA, em particular entre bovinos baguás e bubalinos, seja devido a possível presença de animais portadores dessa virose. Dessa forma, não deve ser descartada a possibilidade de disseminação da doença entre animais domésticos e silvestres devido ao íntimo contato desses na região em estudo conforme revela a Figura 1.

Tanto os suínos domésticos quanto os silvestres, demonstraram um maior número de amostras positivas para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, bem como uma maior média nos títulos encontrados para essa mesma estirpe viral (Figuras 9 e 11/Tabelas 11 e 14). A baixa percentagem de amostras reagentes ao antígeno VIA do VFA nessas espécies (Tabela 2) é explicável pela não persistência de anticorpos para esse antígeno, depois de longo período de tempo após a infecção ou desafio com esse vírus, bem como por não adquirem, como os bovinos e bubalinos, o estado de portador (SUTMÖLLER et al., 1968; HYSLOP, 1970; BLOOD et al., 1983; WOODBURY, 1995).

A ausência de sinais clínicos na população de suínos estudada possivelmente esteja relacionada ao baixo grau de patogenicidade da estirpe viral para essa espécie. De fato, há estirpes virais altamente patogênicas e adaptadas à suínos e não à bovinos e outras espécies, as quais provocam severas lesões e altas taxas de mortalidade nos porcos afetados conforme reportadas por SHANKAR, (1982); BLOOD et al., (1983); UPPAL et al., (1983); TERRERAN et al., (1984); CHAMNANPOOD et al., (1995) e pelo DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO DO SUL (1998 e 2000 (no prelo)). Merece ressalva o fato de, na região de estudo, não ter havido notificação de foco de FA, seja por parte de autoridades sanitárias ou relato da doença por moradores locais.

Situação semelhante pode ser usada para interpretar os resultados da análise sorológica em ovinos, que também não mantêm, por muito tempo, níveis elevados de anticorpos contra antígenos desse vírus (BLOOD et al., 1983; HYSLOP, 1970), exceto quando esses animais forem vacinados e revacinados. Da mesma forma que SAMARA et al., (1981); GARLAND et al. (1981); ABU ELZEIN et al., (1987); NDARATHI (1991) e o DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO DO SUL, (1998, 2000 (no prelo)), relataram a ausência de sinais clínicos de FA em ovinos soropositivos, também os animais amostrados nesse trabalho não apresentaram sintomas da doença. Os carneiros, apresentaram predominância de reatividade a estirpe O₁ Campos (Figura 7). Entretanto, a estirpe C₃ Indaial revelou maior média dos títulos de anticorpos encontrados (Tabela 8).

No que diz respeito a análise efetuada, na etapa de triagem das amostras, segundo a faixa etária dos animais, os resultados do teste de IDGA revelaram, para bovinos baguás, 48% dos soros com reatividade na faixa etária entre

12 a 36 meses de idade, diferindo da prova de BFL-ELISA, na qual os animais acima de 36 meses é que apresentaram uma maior quantidade de amostras positivas (Tabela 3).

No entanto, na etapa de titulação dessas amostras, verificou-se que as estirpes O₁ Campos e A₂₄ Cruzeiro revelaram maiores valores médios para os animais acima de 36 meses, ao contrário da estirpe C₃ Indaial, que apresentou um resultado semelhante a este, em animais entre 12 a 36 meses de idade (Tabela 4). Cabe observar que a reatividade contra a estirpe C₃ Indaial, foi observada em apenas 8 animais que apresentaram títulos superiores a 2,5, no entanto a média foi maior do que a demonstrada pelos soros dos animais, cuja faixa de títulos de anticorpos estava compreendida entre 1,5 e 2,5, e na qual foram classificados 35 animais (Tabela 4).

Nos búfalos, ambos os testes laboratoriais utilizados demonstraram maior número de soros positivos em indivíduos adultos. Entretanto, a análise dos títulos de anticorpos, evidenciou, para as estirpes O₁ Campos e C₃ Indaial, maiores valores médios em animais com até 12 meses de idade. Para a estirpe A₂₄ Cruzeiro, a média mais elevada nos títulos de anticorpos foi observada em indivíduos acima de 36 meses de idade (Tabela 6).

Do total de 19 soros de búfalos adultos amostrados, 13 eram reagentes positivos ao antígeno VIA e, 15, 16 e 14 indivíduos continham anticorpos para as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial, respectivamente. Portanto, quase a totalidade dos animais adultos revelaram a presença de anticorpos para o VFA, sem contudo, terem apresentado sintomas aparentes da doença (Tabela 5). Já no que se refere aos 13 soros colhidos em bubalinos jovens com até 12 meses de idade, 10 continham anticorpos contra o VFA. Destes, 4 animais possuíam idade inferior a 6 meses e demonstraram ser reagentes a uma das três estirpes do VFA segundo revelou o teste BFL-ELISA. Três deles, também apresentaram anticorpos anti-antígeno VIA (Tabela 5). Nesse caso, não pode ser descartada uma possível interferência, de anticorpos passivamente recebidos através do colostro, conforme foi antes demonstrado por PINTO & HEDGER (1978). Com efeito esses anticorpos poderiam estar presentes nos bubalinos neonatos e jovens até cerca de 5 meses e meio de idade, sem que na verdade eles tivessem sofrido infecção pelo VFA.

Nesse aspecto, SAMARA et al. (1987), demonstraram a presença de anticorpos colostrais em búfalos indianos de 3 meses e meio a 5 meses e meio de vida e que eram filhos de mães multivacinadas. Foi reportado ainda, por esses autores, que o número de animais reagentes diminuía à medida em que a idade desses animais aumentava. A partir de 5 meses e meio, os animais não apresentaram reação positiva

até a idade de 12 meses e meio, quando os anticorpos anti-antígenos do VFA voltaram a ser detectados, devido à ocorrência de um surto de FA que havia ocorrido na região.

GOMES (1984), pesquisou níveis de anticorpos colostrais em bovinos de 6 a 169 dias de idade. As colheitas dos soros foram efetuadas antes da vacinação, 105 dias pós-vacinação e 7 dias pós-revacinação. Os resultados revelaram altos títulos de anticorpos em animais até 60 dias na 1ª colheita, diminuindo gradativamente conforme aumentava a idade dos indivíduos evidenciando a proteção passiva. Por ocasião da revacinação, os animais apresentaram resposta secundária elevando, novamente, a titulação.

Em ovinos, e porcos do mato o maior número de amostras positivas bem como a maior média dos títulos, de acordo com os dois testes realizados, foram encontrados em animais adultos, ou seja, maior que 12 e 7 meses, respectivamente (Tabelas 7, 8, 13 e 14). Para ovinos, esses dados, podem ser imputados ao maior número de amostras colhidas nessa faixa etária. Nos suínos silvestres, o número reduzido de lactentes capturados pode justificar a ausência de animais reagentes nessa faixa etária.

Os porcos domésticos apresentaram soros com anticorpos somente para os vírus dos tipos "O" e "A". A maior quantidade de amostras positivas foi encontrada em animais com idade acima de 7 meses. No entanto, a estirpe O₁ Campos demonstrou maior média de títulos em animais entre 2 a 7 meses de idade e a estirpe A₂₄ Cruzeiro em animais com mais de 7 meses de idade. Somente 1 animal foi reagente ao teste de IDGA (Tabela 10 e 11).

A diferença no número de soros positivos entre os locais de colheita de soros de bubalinos, no caso as fazendas "A" e "G", sobre os resultados da presente análise sorológica, acredita-se que se deva mais ao fato de o número de animais amostrados ser bem superior na Fazenda "A" do que na "G". É necessário também salientar que todas as amostras reagentes ao antígeno VIA na prova de IDGA, foram provenientes da primeira propriedade.

Com exceção da Fazenda "C", as demais propriedades onde foram colhidas amostras de ovinos constituem-se em fazendas vizinhas. É interessante notar que essa fazenda, apesar de ter mais animais amostrados, revelou um menor número de amostras soropositivas do que as Fazendas "A" e "D" (Figura 8). Esta última, embora com a quantidade de amostras colhidas semelhante ao da Fazenda "A" (Tabela 2), apresentou maior número de soros reagentes a uma das três estirpes virais de referência, bem como títulos mais elevados (Tabela 9). A grande evidência de soros positivos em animais adultos deve-se ao maior número de amostras colhidas em animais nessa faixa etária, como mencionado anteriormente (Figura 8).

A análise dos resultados sorológicos direcionada a esclarecer a possível influência dos diferentes locais de colheita das amostras de soros de suínos domésticos e silvestres, revelou uma maior quantidade de soros positivos bem como as maiores médias dos títulos encontrados, na Fazenda "B" e "E", respectivamente. Entretanto, nessas propriedades foram colhidas um número menor de amostras do que na Fazenda "A" (Figuras 10 e 12/Tabelas 12 e 15).

As Fazendas "A" e "B" apresentaram-se como propriedades de onde foram colhidas amostras séricas de duas ou mais espécies de bi-ungulados domésticos e silvestres. Dentro desse contexto, o búfalo indiano e o bovino baguá passam a desempenhar um importante papel como fonte de infecção ou como fator desencadeante de surtos da doença para populações susceptíveis conviventes ou próximas a seu habitat natural. De fato, conforme já relatado (MACAULY, 1963, 1964; HEDGER et al., 1969; CONDY & HEDGER, 1974; SAMARA & PINTO, 1983; DAWE et al., 1994a e DAWE et al., 1994b) há possibilidade de ocorrer transmissão do VFA do búfalo africano ou indiano para outras espécies, em ambientes onde ocorra interação entre essas populações, embora isso não possa ter sido demonstrado nesse trabalho.

Em porcos do mato, a avaliação da interferência do ano de colheita revelou um crescente número de amostras positivas (0, 4 e 9 amostras nos anos de 1994, 1996 e 1998, respectivamente) como revela a Figura 12.

Diante dos resultados e inferências acima mencionados, deve-se levar em conta a possibilidade da existência de infecção provocada pelo VFA em espécies domésticas e silvestres bi-ungulados. Esse fato é atestado tanto pelas amostras de soros com presença de anticorpos contra o antígeno VIA ora detectados, como, mais notoriamente, pelos resultados obtidos no teste BFL-ELISA.

Finalmente, é importante salientar que os dados obtidos nesse trabalho enfatizam a necessidade de um estudo complementar planejado, objetivando o isolamento e/ou a detecção de genes ou segmentos gênicos do VFA, a partir do muco esofágico-faríngeo dos bovinos baguás, búfalos indianos e ovinos da região em estudo, pelo fato dos animais dessas espécies serem reconhecidos como portadores do VFA.

6.CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos objetivando a presença de anticorpos anti-antígeno VIA e anti as estirpes O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial do vírus da febre aftosa em algumas espécies de animais silvestres e domésticas susceptíveis e não vacinadas contra essa doença, na sub-região da Nhecolândia, município de Corumbá, no Pantanal de Mato Grosso do Sul, permitem às seguintes conclusões:

1. A ausência de vacinação nas espécies pesquisadas e a ocorrência de anticorpos anti-antígeno VIA , bem como de anticorpos tipo específicos, em maior ou menor reatividade para, pelo menos uma das três estirpes virais em estudo (O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial), em um número significativo de animais amostrados, é indicativo de infecção viral;
2. As percentagens de bovinos (bois baguá em estado feral), bubalinos, ovinos, suínos domésticos e suínos silvestres (porco do mato em estado feral), reagentes ao antígeno VIA foram de 32,1%, 43,6%, 1,4%, 1,6% e 4,1% respectivamente. Estes resultados foram interpretados como sendo devido a ocorrência de replicação viral nos animais investigados, tendo em vista que o antígeno VIA, nas condições em estudo, é capaz de detectar, sem sombra de dúvida, animais infectados;
3. A alta porcentagem de bois baguá (32,1%) e de bubalinos (43,6%) não vacinados, reativos ao antígeno VIA e adicionada ainda a presença de anticorpos anti VFA tipo específicos, são indicativos da presença de animais portadores nestas duas espécies;
4. A reatividade de porcos domésticos (1,6%) e de porcos do mato em estado feral (4,1%) ao antígeno VIA, apesar do pequeno número de amostras reagentes, deve ser interpretada como sendo de infecção recente, tendo em vista que tais espécies animais não se tornam portadoras do vírus da febre aftosa após episódio de infecção por esse vírus.

5. Embora os animais domésticos e silvestres estudados possam ser portadores do mesmo vírus e um poder infectar o outro, não há evidência nesse estudo, que uma população predomine como origem da infecção para a outra.

6. Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-VFA realizados no presente trabalho suportam a hipótese da necessidade de realização de um estudo complementar planejado, objetivando o isolamento viral e/ou a detecção de genes ou segmentos gênicos do VFA, a partir do muco esofágico-faríngeo dos bovinos baguás, búfalos indianos e ovinos desta e de outras sub-regiões do Pantanal sulmatogrossense.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU ELZEIN, E. M. E. et al. The prevalence of antibodies against foot-and-mouth disease in various species of Sudanese livestock following natural infection. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, v.40, n.1, p.7-12, 1987.

ADÂMOLI, J. Fisiografia do Pantanal. In: ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. *Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1987. p.23-5.

ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. *Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1987. 339p. (Documento, 8).

ANDERSON, E. C. Potencial for the transmission of foot-and-mouth disease virus from African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle. *Research in Veterinary Science*, v.40, p.278-80, 1986.

ANDERSON, E. C. et al. The pathogenicity of bovine strains of foot and mouth disease virus for impala and wildbeest. *Journal Wildlife Disease*, v.11, p.248-55, 1975.

ANDERSON, E. C. et al. The role of wild animals, other than buffalo, in the current epidemiology of foot-and-mouth disease in Zimbabwe. *Epidemiology and Infection*, v.111, p.559-63, 1993.

ANGELI, A. B.; PIATTI, R. M.; SUGA, O. Ocorrência da febre aftosa no Estado de São Paulo, no período de 1978 a 1983. *Veterinária Brasileira*, n.5, p.10-6, 1985.

ARAÚJO Jr., J. P. *Padronização do teste imunoenzimático de Bloqueio em Fase Líquida para quantificação de anticorpos contra o vírus da febre aftosa em soros de búfalos indianos (Bubalus bubalis)*. 1994. 93f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ARAÚJO Jr, J. P.; DUARTE, J. M. B. *Estudo sorológico e avaliação do estado de portador do vírus da febre afosa em cervos-do-Pantanal (**Blastocerus dichotomus**) da bacia do rio Paraná: relatório final de pesquisa do Projeto Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera (Blastocerus dichotomus).* Jaboticabal: CESP/FUNEP/UNESP, 2000. p.174-7.

ARAÚJO Jr, J. P.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A. Liquid-phase blocking sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus in water buffalo sera. *American Journal of Veterinary Research*, v.57, n.6, p.840-3, 1996.

BACHRACH, H. L.; TRATMAN, R.; BREESE, S. S. Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus. *American Journal Veterinary Research*, v.25, p.333-42, 1964.

BARTELING, S. J.; MELOEN, R. H. A simple method for the quantification of foot and mouth disease virus (FMDV). *Archiv fuer die Gesamte Virusforschung*, v.45, p.362-64, 1974.

BARMAN, N. N. et al. Foot and mouth disease outbreaks due to FMD virus type "O" in the N. E. states of India during 1985-88. *Indian Journal of Animal Health*, v.29, n.2, p.167-9, 1990.

BELSHAM, G. J. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the Picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress Biophysics and Molecular Biology*, v.60, p.241-60, 1993.

BENGIS, R. G. et al. Foot-and-mouth disease and the African buffalo (*Syncerus caffer*). 1. Carriers as a source of infection for cattle. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.53, p.69-73, 1986.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A.; RODOSTIS, O. M. Doenças causadas por vírus e clamídias-I. In:_____. *Clínica veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p.602-8.

BROWN, F.; CARTWRIGHT, B. Purification of radioactive foot-and-mouth disease virus. *Nature*, v.199, p.1168-70, 1963.

CASTRO, M. P. et al. Relatório de 5 anos da epizootiologia da febre aftosa no Estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.34, n.3, p.223-41, 1967.

CHAMNANPOOD, P. et al. The minor role of pigs in outbreaks of foot-and-mouth disease of northern Thailand. *Australian Veterinary Journal*, v.72, n.4, p.142-4, 1995.

CONDY, J. B.; HEDGER, R. S. The survival of foot-and-mouth disease virus on African buffalo with non transference of infection to domestic cattle. *Research Veterinary Science*, v.16, n.4, p.182-5, 1974.

CONDY, J. B.; HERNIMAN, K. A. J.; HEDGER, R. S. Foot-and-mouth disease in wildlife in Rhodesia and other African territories. *Journal Comparative Pathology*, v.79, p.27-31, 1969.

COWAN, K. M.; GRAVES, J. H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology*, v.30, p.528-40, 1966.

COWAN, K. M.; TRAUTMAN, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. I. Complement fixation reactions with isolated antigenic components. *Journal Immunology*, v.99, p.729-36, 1967.

DAWE, P. S. et al. Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African Buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *Veterinary Record*, v.134, p.211-5, 1994a.

DAWE, P. S. et al. Natural transmission of foot-and-mouth disease virus from African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in a wildlife area of Zimbabwe. *Veterinary Record*, v.134, p.230-2, 1994b.

DAWE, P. S.; PINTO, A. A. Antibody responses to type-specific and virus -infection-associated antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent foot and mouth disease virus in north Malawi. *British Veterinary Journal*, v.134, p.504-11, 1978.

DE MELLO, P. A.; LA TORRE, J. Características gerais, componentes macromoleculares e estrutura do vírus da febre aftosa. *Hora Veterinária*, n.17, p.36-41, 1984.

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO DO SUL – IAGRO/MS. *Relatório de Emergência Sanitária em Mato Grosso do sul - Eliminação dos focos de febre aftosa ocorridos em Porto Murtinho*. Campo Grande, 1998. 145p.

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E DEFESA AGROPECUÁRIA DE MATO GROSSO DO SUL – IAGRO/MS. *Relatório final das ações realizadas para a eliminação do foco de Febre aftosa no município de Naviraí*. Campo Grande, 2000. No prelo.

ESTERHUYSEN, J. J. et al. Buffalo in the Northern Natal Game Parks show no serological evidence of infection with foot-and-mouth disease virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.52, p.63-6, 1985.

FERNANDEZ, A. A.; FERNANDES, M. V. Experimental inoculation of sheep with foot-and-mouth disease virus. *Bulletin Office International Epizooties*, v.73, n.5-6, p.507-20, 1970.

FERRIS, N. P. et al. Inactivation, purification and stability of 146S antigens of foot-and-mouth disease virus for use as reagents in complement fixation test. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.3, p.339-50, 1984.

FORSS, S. et al. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, v.12, p.6587-601, 1984.

GARLAND, A. J. M. et al. The 1975 foot and mouth disease epidemic in Malta. II: The detection of carriers and inapparent infection. *British Journal Veterinary*, v.137, p.381-7, 1981.

GOMES, I. Observaciones sobre la influencia de anticuerpos colostrales em la respuesta anamnética de terneros revacunados contra la fiebre aftosa. *Boletín del Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa*, v.49-50, p.19-22, 1984.

GOMES, I.; ROSENBERG, F. J. A possible role of capybaras (*Hydrochoerus hydrochoeris hydrochoeris*) in foot-and-mouth disease (FMD) endemicity. *Preventive Veterinary Medicine*, v.3, p.197-205, 1984.

GRAVES, J. H.; COWAN, K. M.; TRAUTMAN, R. Immunological studies of foot-and-mouth disease. II. Characterization of RNA free virus like particles. *Virology*, v.34, p.269-74, 1968.

HAJELA, S. K.; SHARMA, S. K. A note on foot-and-mouth disease atypic in buffalo calves. *Indian Veterinary Medicine Journal*, v.2, n.2, p.103-4, 1978.

HAMBLIN, C.; BARNETT, I. T. R.; HEDGER, R. S. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus I. Development and method of ELISA. *Journal of Immunological Methods*, v.93, p.115-21, 1986.

HANCOCH, R. D.; PRADO, J. A. P. Foot-and-mouth disease in a flock of sheep in southern Brazil. *Veterinary Record*, v.132, n.11, p.278-9, 1993.

HAVE, P.; LEI, J. C.; SCHJERNING-THIESEN, K. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease - Characterization and comparison with complement fixation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.25, p.280-96, 1984.

HEDGER, R. S. Foot-and-mouth disease in wildlife with particular reference to the african buffalo (*Syncerus caffer*). In: PAGE, L. A. *Wildlife Diseases*. New York: Plenum Publishing Cooperation, 1976. p.235-44.

HEDGER, R. S.; CONDY, J. B.; FALCONER, J. The isolation of foot-and-mouth disease virus from African buffalo (*Syncerus caffer*). *The Veterinary Record*, v.84, p.516-7, 1969.

HEDGER, R. S.; CONDY, J. B.; GOLDING, S. M. Infection of some species of african wildlife with foot-and-mouth disease virus. *Journal of Comparative Pathology*, v.82, p.455-61, 1972.

HYSLOP, N. ST. G. The epizootiology and epidemiology of foot-and-mouth disease. *Advances Veterinary Science*, v.14, p.261-307, 1970.

JEREZ, J. A.; PINTO, A. A. Alguns aspectos da febre aftosa em animais selvagens. *Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.3, n.1/2, p.91-8, 1979.

JEREZ, J. A. et al. Febre aftosa em búfalos (*Bubalus bubalis*, LINNAEUS, 1758): Pesquisa de anticorpos antiantígeno VIA e isolamento do vírus. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.46, n.3/4, p.111-6, 1979.

KOTAIT, I. et al. Diagnóstico laboratorial de febre aftosa no Estado de São Paulo no período de 1974-1977. *Biológico*, v.45, n.1/2, p.25-42, 1979.

LAWMAN, M. J. P. et al. A preliminary survey of British deer for antibody to some virus diseases of farm animals. *British Veterinary Journal*, v.134, n.85, p.85-91, 1978.

MACAULAY, J. W. Foot-and-mouth disease in non-domestic animals. *Bulletin Epizootic Diseases of Africa*, v.11, p.143-6, 1963.

MACAULAY, J. W. A check-list of non-domestic animals reported to have been infected with foot-and-mouth disease. *Bulletin Epizootic Diseases of Africa*, v.12, p.127-8, 1964.

MATHIAS, L. M. et al. Estudio serologico de fiebre aftosa en bovinos procedentes del Pantanal Matogrosense, Brasil. *Boletín del Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa*, n.41/42, p.3-8, 1981.

McVICAR, J. W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and mouth disease: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *American Journal of Epidemiology*, v.92, n.4, p.273-8, 1970.

MINOR, P. Picornaviridae. In: FRANCKI, R. I. B. et al. *Classification and nomenclature of viruses*. New York: Springer-Verlag Wien, 1991. p.320-6.

MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; PINTO, A. A. Aplicação de uma técnica de ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") no diagnóstico direto do vírus da febre aftosa. *Revista Microbiologia*, v.18, n.1, p.12-24, 1987.

MORAES, G. M.; PAES, R. C. S.; CAVALLERO, J. C. M. Inquérito soroepidemiológico sobre febre aftosa realizado em bovinos no Pantanal Sul-mato-grossense, Brasil. *Boletín del Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa*, v.62-63, p.21-33, 1997.

NDARATHI, C. M. Unvaccinated sheep and goats in Kenya sero-positive to foot-and-mouth disease. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.61, n.9, p.917-9, 1991.

PALING, R. W.; JESSETT, D. M.; HEATH, B. R. The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and domestic herbivores, including camels, in Kenya. I. Viral diseases: a serologic survey with special reference to foot-and-mouth disease. *Journal Wildlife Disease*, v.15, n.2, p.251-8, 1979.

PASSOS, E. C. et al. Diagnóstico da febre aftosa no Estado de São Paulo no período de 1984 a 1994. *Biológico*, v.56, n.1/2, p.11-3, 1990/1994.

PASTORET, P. P. et al. Enfermedades de la fauna salvaje transmisibles a los animales domésticos. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.7, n.4, p.737-71, 1988.

PINTO, A. A.; GARLAND, J. M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. *Journal of Hygiene*, v.82, n.41, p.41-50, 1979.

PINTO, A. A.; HEDGER, R. S. The detection of antibody to virus-infection associated (VIA) antigen in various species of african wildlife following natural and experimental infection with foot and mouth disease virus. *Archives of Virology*, v.57, p.307-14, 1978.

PUSTIGLIONE NETTO, L. et al. Ocorrência da febre aftosa e estomatite vesicular no Estado de São Paulo, no biênio 1967-1968. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.36, n.3, p.129-34, 1969.

PUSTIGLIONE NETTO, L. et al. Ocorrência da febre aftosa no Estado de São Paulo, no quinquênio 1969-1973. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.41, n.4, p.185-9, 1974.

POTT, A. *Pastagens das sub-regiões do Paiaguás e da Nhecolândia do Pantanal Mato-grossense*. Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1981. 48p. (Circular Técnica, 10).

RUECKERT, R. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fundamental virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.477-522.

SAMARA, S. I.; PINTO A. A. Detection of foot-and-mouth disease carriers among water buffalo (*Bubalus bubalis*) after an outbreak of disease in cattle. *Veterinary Record*, v.113, p.472-3, 1983.

SAMARA, S. I. et al. Pesquisa de anticorpos anti antígeno VIA ("Virus-Infeccion Associated") do vírus da Febre Aftosa em búfalos (*Bubalus Bubalis*, LINNAEUS, 1758), ovinos e caprinos de alguns municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.18, n.2, p.131-7, 1981.

SAMARA, S. I. et al. Persistence of colostral antibodies against virus-infection-associated (VIA) antigen and virus neutralizing antibodies induced by natural infection with foot-and-mouth disease virus in indian buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.24, n.1, p.35-40, 1987.

SHANKAR, H. Epidemiological investigation of an outbreak of foot and mouth disease in pigs. *Indian Veterinary Journal*, v.59, p.173-6, 1982.

SHIMSHONY, A. et al. Malignant foot-and-mouth disease in mountain gazelles. *Veterinary Record*, v.119, p.175-6, 1986.

SUTMÖLLER, P.; GAGGERO, A. Foot and mouth disease virus carriers. *Veterinary Record*, v.77, p.968-9, 1965.

SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J. W.; COTTRAL, G. E. The epizootiological importance of foot and mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot and mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Archiv fuer Gesamte Virusforschung*, v.23, p.227-35, 1968.

TERRERAN, M. T.; NETTO, L. P.; DO NASCIMENTO, C. L. G. Relato epidemiológico de um surto de febre aftosa: estudo da susceptibilidade das espécies bovina e suína a uma amostra de vírus de campo. *Biológico*, v.50, n.3, p.55-7, 1984.

TRAPP, E. E. O veado campeiro (*Mazama americana*, ERXLEBEN, 1777) como possível disseminador da febre aftosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 3., 1945, Porto Alegre. *Anais...*p.612-4.

URBAIN, A.; BULLIER, P.; NOUVEL, J. Au sujet d'une petite épizootie de fièvre aphteuse ayant sévi sur des animaux sauvages captivité. *Bulletin de Academie Vétérinaire*, v.11, p.59-73, 1938.

UPPAL, P. K. et al. Foot and mouth disease in pigs and propagation of the isolated virus in tissue culture. *Indian Veterinary Journal*, v.60, p.495-6, 1983.

VAN BEKKUN, J. G. et al. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v.84, p.1159-64, 1959.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicin. *Bulletin World Health Organization*, v.53, p.55-65, 1976.

WILSON, M. B.; NAKANE, P. K. Recent developments in periodate method conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W.; HOLUBAR, L.; WICK, G. (Ed). *Immunofluorescence and related techniques*. Amsterdam: Elsevier - North Holland Biomedicas, 1978. p.215.

WOODBURY, E. L. A review of the possible mechanisms for the persistence of foot-and-mouth disease virus. *Epidemiology Infection*, v.114, p.1-13, 1995.

YOUNG, P. L. et al. Foot-and-mouth disease in cattle, buffalo and sheep in Java. *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.11, p.389, 1985.

ABSTRACT

A serologic survey, using Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and Liquid Phase Blocking-ELISA (LPB-ELISA) were assessed in this study, in the period from 1996 to 1998, to detect or titer, respectively, antibodies to Virus Infection Associated Antigen (VIAA) and the foot-and-mouth disease virus (FMDV) O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro e C₃ Indaial reference strains, in non-vaccinated domestic and wild susceptible animal species. A total of 383 blood serum samples were collected from free-ranging cattle (78 samples), water buffalo (39 samples), sheep (139 samples), domestic (63 samples) and wild pigs (49 samples) and deers (15 samples), living in the Pantanal (Nhecolândia region) of Mato Grosso do Sul State, Brazil. All the investigated species, excepting deer, showed positive animals to FMDV antigens. The AGID detected a total of 47 (12,3%) positive animals for VIA antigen, mostly of them were free-living cattle and buffalo. The LPD-ELISA identified 175 (45,7%) serum samples as reactive to FMDV antigens, specially among cattle, buffalo and sheep. The predominant reactivity to FMDV antigens, characterized by the higher number of positives and the higher antibodies titers, were detected to C₃ Indaial strain, particularly among the free-living cattle. Buffaloes and pigs showed, in turn, a prominent reactivity to A₂₄ Cruzeiro strain, while sheep reacted more to O₁ Campos strain, though buffalo and sheep serum samples had higher antibody titers to C₃ Indaial strain. The highest frequency of positive animals to VIA antigen were found in free-ranging cattle, whose age ranged from 12 to 36 months, contrasting to the results of LPB-ELISA that detected the highest rate of positives in the older bovines (≥ 36 months). The older animals from other species demonstrated, in both serological tests, the highest frequency of positivity. Concluding, the detection of animals positive to the antigens of FMDV among the non-vaccinated individuals from susceptible species living in Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil, particularly the results in adults and in domestic and wild pigs, indicate the occurrence of viral activity and consequently the presence of potencial carriers of this virus in this region.