

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DA
REGIÃO DE ARAÇATUBA – SÃO PAULO, BRASIL

Adriana Hellmeister de Campos Nogueira

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DA
REGIÃO DE ARAÇATUBA – SÃO PAULO, BRASIL**

Adriana Hellmeister de Campos Nogueira
Orientadora: Prof. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2008

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

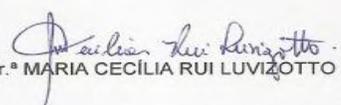
TÍTULO: Prevalência da língua azul em ovinos da região de Araçatuba -
São Paulo - Brasil.

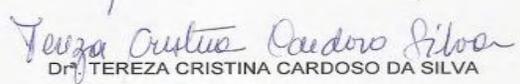
AUTOR: ADRIANA HELLMEISTER DE CAMPOS NOGUEIRA

ORIENTADOR: Dr.^a TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

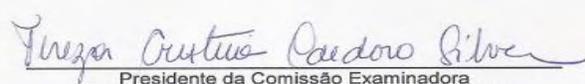
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr.^a EDVIGES MARISTELA PITUCO


Dr.^a MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO


Dr.^a TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

DATA DA REALIZAÇÃO: 20 de agosto de 2008.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ADRIANA HELLMEISTER DE CAMPOS NOGUEIRA - nascida em 19 de dezembro de 1978, na cidade de São Paulo, graduada em 2001 em Medicina Veterinária pela Universidade Bandeirante de São Paulo - UNIBAN – SP, residência na área de Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais pela Universidade de Santo Amaro – UNISA – SP, finalizada no ano de 2003. Em 2005 foi admitida por meio de Concurso público da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, onde atualmente exerce o cargo de Pesquisadora Científica junto à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA Regional na área de Sanidade Animal do Laboratório do Pólo Extremo Oeste locado em Araçatuba – SP. Em 2007 iniciou o curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Faculdade de Odontologia, *Campus* de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista.

“Procure os seus caminhos,
mas não magoe ninguém nessa procura.
Arrependa-se, volte atrás, peça perdão!
Não se acostume com o que não o faz feliz,
revolte-se quando julgar necessário.
Alague seu coração de esperanças,
mas não deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado,
comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se perca!
Se o achar segure-o!”
(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus, por ter me dado saúde, disposição e coragem, por abrir portas e permitir que eu atinja meus objetivos e sonhos, por ter me protegido nas minhas infinitas idas e vindas, por permitir a convivência com pessoas maravilhosas e me dar força para superar cada obstáculo, realizando-o da melhor maneira possível.

Aos meus pais, Angela e Eduardo, que são exemplos de vida, vocês são batalhadores, vencedores e fortes, fazendo com que eu consiga alcançar meus sonhos e mais esta vitória, sempre me colocando ao lado de pessoas certas, me protegendo, me dando inspiração e coragem para eu seguir o meu destino da melhor forma possível.

Às minhas irmãs, Juliana e Luana pelo companheirismo e compreensão pela minha ausência.

Aos meus avôs, Plínio, Maria Angela, Tata e Papo, grandes pessoas, exemplos de vida, competência, conhecimento e sabedoria.

À todos os meus tios, Ricardo, Fernando, Ruy, Plínio (*in memoriam*), tias, Evelyn, Lúcia, Andréa, primos e primas, Pri, Ruysinho, Luca, Lucas, Nina, Guilherme, Leonardo e Fernanda, ao meu afilhado, Gustavo, que sempre torceram e me apoiaram em todos os momentos.

Ao meu grande amor André, pelo incentivo, apoio e compreensão, em todos os momentos, que são fundamentais para alcançar a vitória na carreira, é muito bom ter você em meu coração, aprendi muito com você nesses 12 anos juntos. Mais um dos objetivos cumpridos, devo a você!!! Agora não tem mais desculpa para me enrolar viu....

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, Curso de Medicina Veterinária por me proporcionar esta chance de realização do mestrado;

À amiga, colega e orientadora Tereza Cristina Cardoso, pela confiança depositada em mim, por fazer parte de mais uma das minhas etapas profissionais, o mestrado, me orientando, mesmo sem me conhecer

anteriormente, pela paciência, disponibilidade, e “floreadas” nos meus textos “sucintos e diretos” e dedicação em todas as etapas do trabalho. Obrigada pelo apoio e chance!!

À FAPESP - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e FUNDUNESP pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

À APTA – Agência Paulista de Tecnologia Agropecuária, por me dar a chance de cursar o mestrado.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, por liberar a compra dos Kits junto ao Centro Pan-americano de Febre Aftosa, sem eles este trabalho seria impossível.

Às pesquisadoras Edviges Maristela Pituco e Eliana De Stefano do Laboratório de Vírus dos Bovídeos do Instituto Biológico, por ceder o Laboratório à pesquisa, pelos ensinamentos e auxílio nas análises laboratoriais, incansáveis correções de textos, artigos,... e por serem exemplo de profissionais a serem seguidas. Obrigada por tudo!!

À professora, doutora Roseli Aparecida Leandro da Esalq - USP, por me passar uma pequena parte de sua sabedoria para que eu pudesse realizar o teste Bayesiano da tese.

Às veterinárias Adriana Lombardi e Flávia Feres pela companhia e ajuda nas inúmeras e divertidas coletas. O trabalho em equipe foi fundamental!!

Ao diretor do Pólo Extremo Oeste João J.A.A. Demarchi, pelo incentivo do ingresso ao Mestrado.

Às pesquisadoras da APTA Laboratório de Sanidade Animal – UPD Araçatuba, Vera e Clara, pela colaboração no desenvolver do trabalho.

Aos funcionários Cida e Sr. Florindo do Laboratório de Sanidade Animal e Vegetal – UPD Araçatuba por todo apoio.

Aos funcionários do Laboratório de Vírus de Bovídeos - IB, por toda a ajuda prestada.

À Clarice e Leandro, por realizarem os testes de VN.

À Cláudia, pela ajuda nas fórmulas dos resultados do ELISA.

Ao Núcleo de Ovinos de Araçatuba, proprietários das cabanhas e seus funcionários por disponibilizar seus animais para coleta e seus tempos, pois sem eles, não haveria experimento.

Aos professores das disciplinas cursadas na UNESP – Araçatuba, aumentando o meu conhecimento em diversas áreas.

Aos meus amigos de pós-graduação, pelos diversos seminários, disciplinas e horas divertidas que passamos.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação Marina, Valéria e Diogo, pela competência, pela atenção dispensada, pela simpatia e pronto atendimento em todos os momentos necessários.

Aos funcionários da biblioteca, em especial a Isabel e Fátima, que me ajudaram na confecção e correção da tese e apoio durante as pesquisas bibliográficas.

E a todos que de forma direta ou indireta, de longe ou de perto que fizeram parte da concretização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
Referências.....	33
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	45
Resumo.....	45
Introdução.....	47
Material e métodos.....	50
Resultados e discussão.....	52
Referências bibliográficas.....	57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
FIGURA 1 - Sintomas leves apresentados por infecção experimental de ovinos mantidos em isoladores A) Apatia, depressão; B) Conjuntivite; C) Gengivite e D) Edema e hiperemia do trato respiratório superior.....	15
FIGURA 2 - Sintomas moderados apresentados por infecção experimental de ovinos mantidos em isoladores: A) Conjuntivite e epífora; B) Severa secreção no trato respiratório com edema e hiperemia; C) Coronite.....	16
FIGURA 3 - Sintomas graves ocasionados por infecção experimental em ovinos mantidos em isoladores: A) Sialorréia; B) Cianose da língua, característico do nome da doença "Blue Tongue Disease" e edema de face.....	17
FIGURA 4 - Partícula viral <i>Orbivirus</i> completa onde em Azul escuro = VP5 e Azul claro = VP2.....	19
FIGURA 5 - A) Partícula do VLA completa; B) camada mais externa do capsídeo; C) camada mais interna do capsídeo; D) Estrutura tridimensional da proteína viral VP3; E) Estrutura tridimensional da proteína viral VP7.....	20
FIGURA 6 - Taxonomia dos RNA de fita dupla, em Famílias e Gêneros, incluindo o Gênero <i>Orbivirus</i>	21
FIGURA 7 - Árvore filogenética dos 24 sorotipos do VLA.....	23
FIGURA 8 - Demonstração do vetor <i>Culicoides</i> sp se alimentando durante a fase reprodutiva das fêmeas.....	25
TABELA 1 - Classificação, propriedades biológicas e localização das proteínas virais pertencentes ao VLA.....	22

PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DA REGIÃO DE ARAÇATUBA – SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO - A língua azul é uma doença viral, cujo agente etiológico pertence à família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus*, transmitida por um vetor (artrópode) hematófago, do gênero *Culicoides*. Por se tratar de doença confundível com Febre Aftosa está incluída na lista de diagnóstico diferencial juntamente com Estomatite Vesicular, Varíola Ovina, Ectima Contagioso. O estudo teve como objetivo detectar a presença de anticorpos para língua azul em ovinos da região de Araçatuba, por ser esta uma região com rebanho expressivo e condições climáticas favoráveis à multiplicação de insetos. As amostras foram colhidas ao longo do ano de 2006, de ovinos adultos, em fase reprodutiva, (acima de 12 meses e com pelo menos uma parição, ou em caso de machos sexualmente maduros) e sem sintomas característicos da doença, de ambos os sexos, cadastrados no Núcleo de Produtores de Ovinos da Região de Araçatuba, distribuídas nos municípios da Região administrativa de Araçatuba. O tamanho da amostras foi calculado, considerando-se distribuição normal, prevalência de 50%, nível de confiança de 95% e precisão absoluta de 3%. Foram analisadas 1002 amostras de soros ovinos adultos, provenientes de 31 cabanhas, pelas provas de imunodifusão dupla em gel de agar (IDGA) e ELISA (Enzyme Linked immunosorbent Assay) de competição da fase sólida (ELISA CFS), provenientes do Centro Panamericano de Febre aftosa. Dessas amostras, 744 (74,3%) foram reagentes ao vírus da língua azul, pelo teste de ELISA–CFS e 651 (65,1%), pela técnica de IDGA. Não houve associação significativa entre prevalência da doença e o sexo dos animais. Esses resultados revelam que o Vírus da Língua Azul encontra-se disseminado nessas regiões, sugerindo a ocorrência de infecções inaparente.

Palavras chaves: diagnóstico, IDGA, ELISA, ovinos

BLUETONGUE VIRUS ANTIBODIES DETECTIONS IN SHEEP FROM ARAÇATUBA REGION –SAO PAULO, BRAZIL

SUMMARY - Bluetongue (BT) is an infectious, non-contagious, insect-born viral disease of Ruminants. The causative agent of BT is bluetongue virus (BTV) that belongs to the family *Reoviridae* genus *Orbivirus*. Insect vectors in the genus *Culicoides* transmit this virus. BT affects domestic and wild ruminants, however small ruminants are considered the most affected specie. BT is included in the OIE list based on the differential diagnosis with Foot and Mouth Disease (FMDV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Sheep Pox Virus (SPV). The aim of the study was to detect antibodies against BTV in commercial sheep farms, of the Northeastern region of Sao Paulo State, Brazil. The size of the samples was calculated, considering normal distribution, prevalence of 50%, confidence level of 95% and absolute precision of 3%.A total of 1002 sera samples collected from adult sheep (above 1 year-old), comprising a total of 31 farms, were screened for the presence of BTV antibodies, by agar gel immunodiffusion test (AGID) and ELISA-CFS (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – competitive solid phase), both produced by Pan American Center of FMDV. From a total of 744 samples 74,3% were positive by ELISA – CFS and 651 (65,1%) were positive by AGID. There was no significant association between prevalence of the disease and sex of animals. These results suggest that the BTV is widespread among farms, probably causing subclinical infections, with high level of antibodies.

Keywords: diagnosis, AGID, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, sheep

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

O rebanho brasileiro detém um efetivo de 16.019.170 cabeças sendo que a região nordeste concentra o maior número de animais, seguida pela região sul, centro-oeste, sudeste e norte (IBGE, 2006). O crescimento da ovinocultura de corte e sua expansão para outras regiões produtoras têm sido impulsionados pelo elevado potencial do mercado consumidor de grandes centros urbanos (SIQUEIRA, 1996).

O grande potencial da ovinocultura no Brasil, principalmente na região sudeste, que compreende o maior mercado consumidor do país, fundamenta-se na crescente aceitação da carne de cordeiro, cuja produção não tem sido suficiente para atender à demanda do mercado interno e tem resultado no aumento da importação de ovinos vivos, carcaças e carne congelada ou refrigerada.

O estado de São Paulo, que detém o maior rebanho da região sudeste, com aproximadamente 378 mil cabeças (IBGE, 2006), tem apresentado nos últimos anos um considerável aumento não apenas do número de cabeças como também de criadores interessados em investir no setor.

A região de Araçatuba, que esta em segundo lugar em número de cabeças de ovinos na região Sudeste, onde a pecuária bovina de corte vem perdendo espaço para outras atividades, a ovinocultura apresenta-se como uma atraente alternativa, principalmente para pequenos e médios produtores, por não exigir grandes áreas e pelo fato dos ovinos demonstrarem maior

produção de carne/ha/ano quando comparados com bovinos sob as mesmas condições de criação a pasto, além de possibilitarem um giro mais rápido de capital. Entre os ruminantes, as espécies caprina e ovina são as que apresentam o menor tempo entre o nascimento e o abate (SORIO, 2005).

Apesar de todas as perspectivas favoráveis para o seu desenvolvimento, a viabilidade econômica da atividade vai depender de uma série de fatores e entre estes, o uso de técnicas adequadas de manejo que assegurem oferta constante de produtos de qualidade a preços competitivos.

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

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

A Língua Azul (LA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2006) e há restrições à movimentação internacional dos animais e seus produtos. Esta enfermidade reconhecida pela primeira vez na África do Sul no final do século XVIII e foi descrita com detalhes por Hutchen em 1902, foi denominada de "Epizootia catarral das ovelhas". Em 1902 ainda sem conhecer a etiologia, foi proposto o nome de Língua Azul (RONDEROS et al., 2003)

devido à inflamação observada na língua e na mucosa oral, que apresenta uma coloração roxa escura ou azulada. Em 1906 demonstrou-se que a doença era causada por vírus, injetando-se sangue filtrado de ovelhas doentes em animais susceptíveis, reproduzindo dessa forma a doença clínica (THEILER, 1906).

Em meados do século XX, DuToit (1944) demonstrou a transmissão da enfermidade por meio de *Culicoides* e Neitz caracterizou os diversos sorotipos virais, mostrando que não induziam uma resposta de proteção imunológica cruzada. Em 1952 o vírus da Língua Azul foi isolado nos Estados Unidos (Califórnia) a partir de um foco em ovinos.

Segundo relatam Cunha et al. (1987; 1988) a LA surgiu no Brasil em decorrência da importação de animais de raças leiteiras contaminadas. Primeiramente relatada por Silva em 1978 que descreveu anticorpos contra o vírus da língua azul (VLA) em ovinos e bovinos no Estado de São Paulo, sendo o primeiro da América do Sul a identificar a presença do vírus em seus rebanhos (LOBATO, 1999).

Ruminantes são susceptíveis ao vírus causador da LA, em geral a infecção ocorre de forma não aparente, com exceção dos ovinos, que podem manifestar sinais evidentes, com diminuição na produção e mortalidade elevada (LOBATO, 1999). Uma vez a doença instalada, os sinais são variados (Figuras 1, 2 e 3) ; na forma subaguda, os cordeiros apresentam-se debilitados, ocorre abortamento, anomalias congênitas, e baixo índice de mortalidade. Em contrapartida na forma aguda, ocorre febre que pode chegar a 42° C, inflamação, erosão e necrose da mucosa oral, edema de língua, cianose,

abortos, coronite, pododermatite, morte entre 8 a 10 dias, ou pode ocorrer a recuperação, que é lenta com esterilidade e atraso de crescimento (WALTON,1980). Segundo Erasmus (1975) os sinais observados com mais freqüência são edema facial, erosão e ulceração do trato gastro intestinal, coronite com conseqüente claudicação e febre alta. Dessa forma, alguns destes sinais clínicos podem ser confundidos com febre aftosa, febre catarral maligna, dermatite pustular contagiosa, poxvirus, doença da fronteira, “foot root” e actinobacilose sendo, portanto o diagnóstico diferencial de fundamental importância. O controle destas ocorrências, bem como seu diagnóstico é fundamental em virtude das barreiras sanitárias impostas ao Brasil em decorrência destas enfermidades a exemplo do ocorrido com Febre Aftosa nos Estados do Mato Grosso e Paraná em 2005.

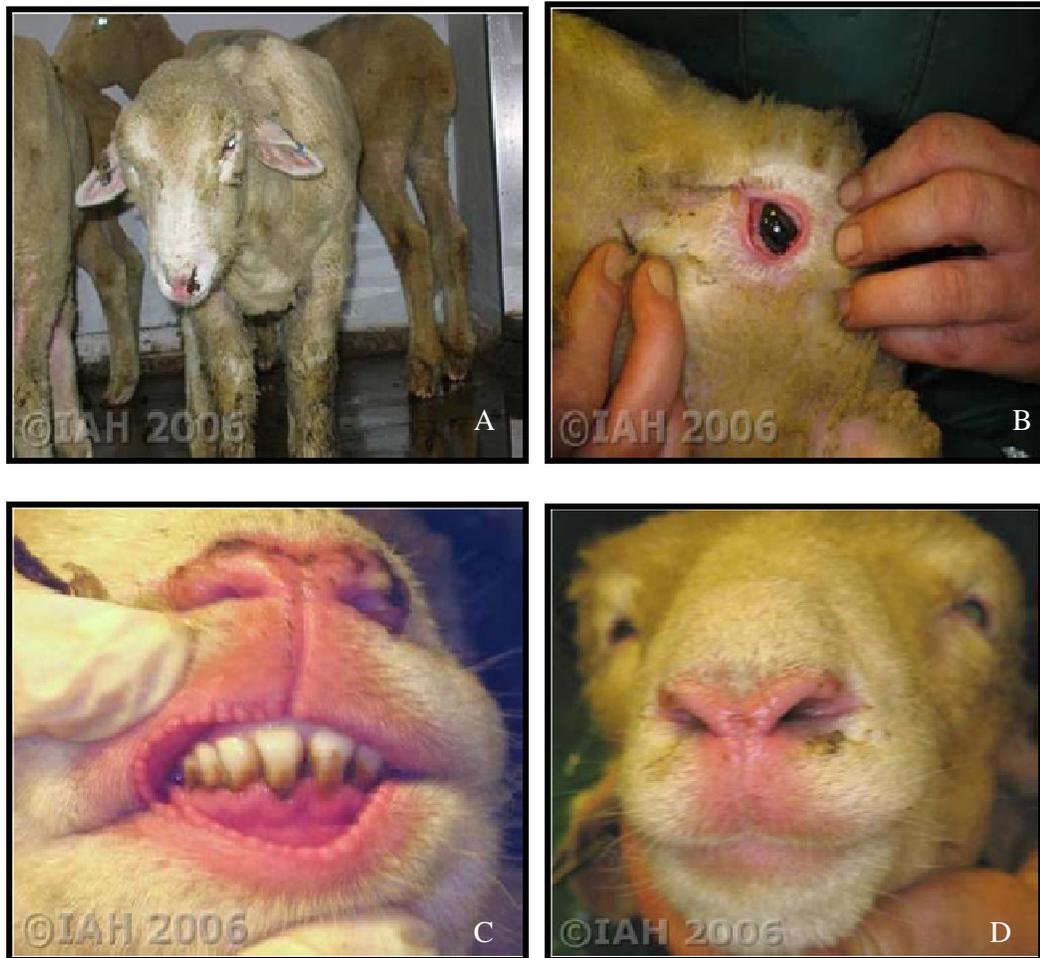


FIGURA 1 - Sintomas leves apresentados por infecção experimental de ovinos mantidos em isoladores **A)** Apatia, depressão; **B)** Conjuntivite; **C)** Gengivite e **D)** Edema e hiperemia do trato respiratório superior (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH, 2007 a)



FIGURA 2 - Sintomas moderados apresentados por infecção experimental de ovinos mantidos em isoladores: **A)** Conjuntivite e epífora; **B)** Severa secreção no trato respiratório com edema e hiperemia; **C)** Coronite (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH, 2007 b)



FIGURA 3 - Sintomas graves ocasionados por infecção experimental em ovinos mantidos em isoladores: **A)** Sialorréia; **B)** Cianose da língua, sinal que originou o nome da doença "Blue Tongue Disease" e edema de face (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH, 2007 c)

As lesões macroscópicas da LA variam de acordo com o estágio da doença, do sorotipo do vírus infectante e das condições ambientais. As lesões geralmente são visíveis durante os últimos estágios da doença e correspondem à congestão, edema e hemorragia das mucosas oral e esofágica, palato mole, bexiga, rins, pré-estômagos, pulmões, baço, laminite, degeneração muscular e ulcerações do epitélio da língua (PARSONSON, 1990). As lesões microscópicas caracterizam-se por infiltrado celular inflamatória, vacuolização celular, estase sanguínea, hipertrofia das células endoteliais dos vasos pouco calibrosos e fragmentação dos mesmos (MICHELSEN, 1990). As lesões anátomo-patológicas da LA são decorrentes dos danos causados pelo Vírus da Língua Azul (VLA) nos capilares sanguíneos, que resultam em aumento de permeabilidade vascular, edema, hemorragia, trombose, isquemia e necrose das mais variadas estruturas e órgãos (PARSONSON, 1990).

A grande importância de se determinar os animais portadores é o fato do gado bovino, quando infectado, apresentar uma longa viremia, de tal forma que atua como reservatório, a partir do qual, os vetores podem se contaminar e transmitir o vírus a outros ruminantes como os ovinos (GORCHS; LAGER, 2001). Essa viremia em bovinos pode chegar a 70 dias e em ovinos varia de 14 a 28 dias (FENNER et al., 1993).

Uma vez detectada, a LA apresenta conseqüências sócio-econômicas ou sanitárias graves, com repercussão severa no comércio internacional de animais e produtos de origem animal, sendo que, uma vez introduzida em um

determinado país, a possibilidade de sua erradicação é pequena (KONRAD et al., 2003).

O VLA é o protótipo do gênero *Orbivirus* (Figura 4 e 5), da família *Reoviridae* (Figura 6), os quais são arbovírus, transmitidos por artrópodes (FENNER et al., 1992) que se infectam ao ingerirem sangue de vertebrados no período de viremia, com replicação viral nos tecidos dos artrópodes que os transmitem através da picada (JUBB et al., 1993). A família *Reoviridae*, cuja característica mais relevante é a dupla fita de RNA constituído de 10 a 12 segmentos independentes e simetria icosaédrica, são partículas virais não envelopadas que se replicam no citoplasma, e deixam à célula infectada por lise celular (FENNER et al., 1992). A caracterização das proteínas virais, bem como sua localização e função biológicas estão resumidas na Tabela 1.

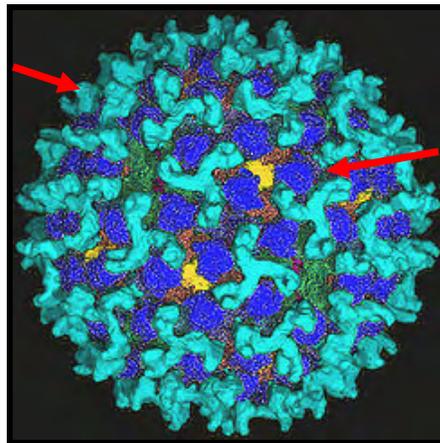


FIGURA 4 - Partícula viral *Orbivirus* completa: azul escuro = VP5 e azul claro = VP2. (MICROBIOLOGY BYTES,2008).

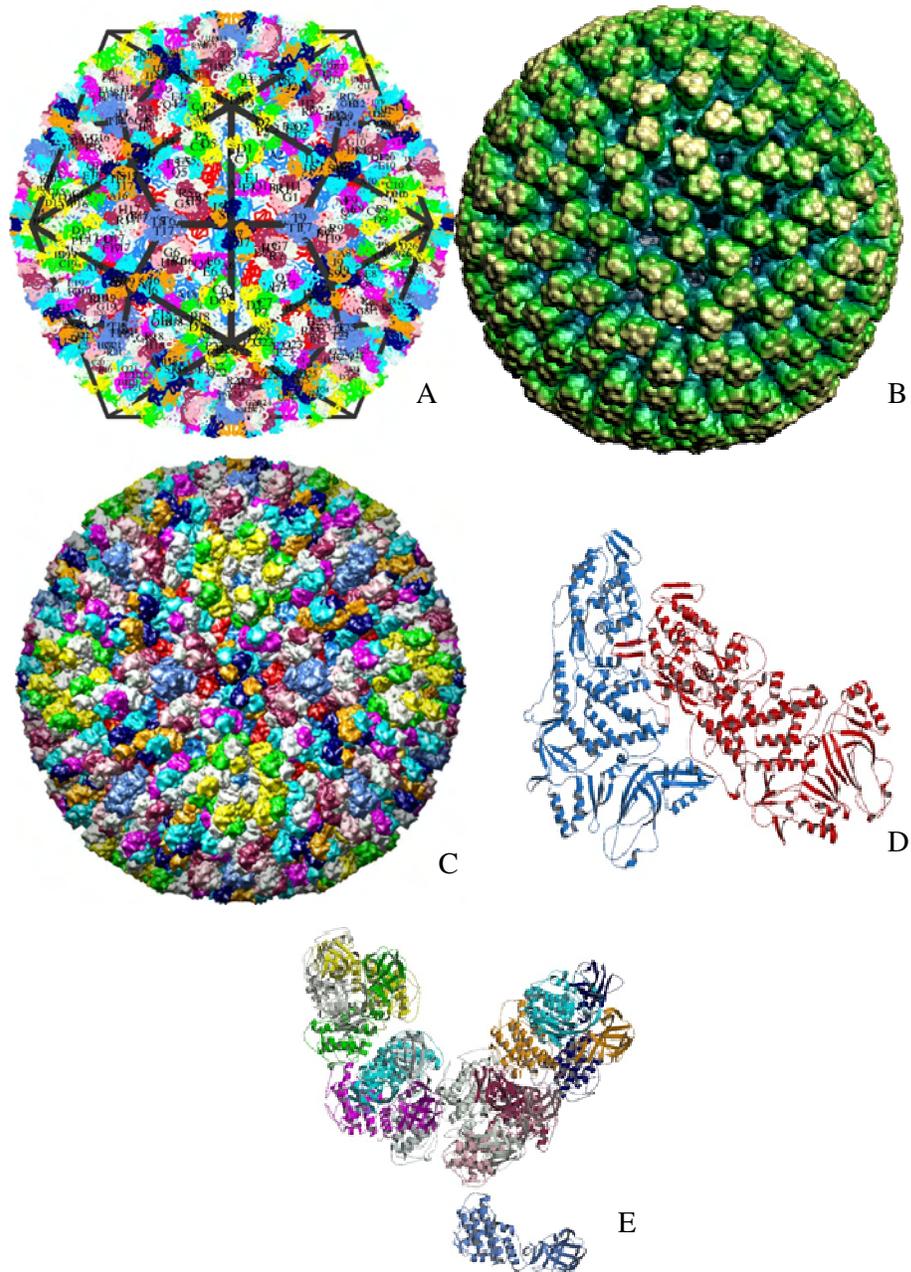


FIGURA 5 - A) Partícula do VLA completa; B) camada mais externa do capsídeo; C) camada mais interna do capsídeo; D) Estrutura tridimensional da proteína viral VP3; E) Estrutura tridimensional da proteína viral VP7 (VIPERDB VIRUS PARTICLE EXPLORER, 2008).

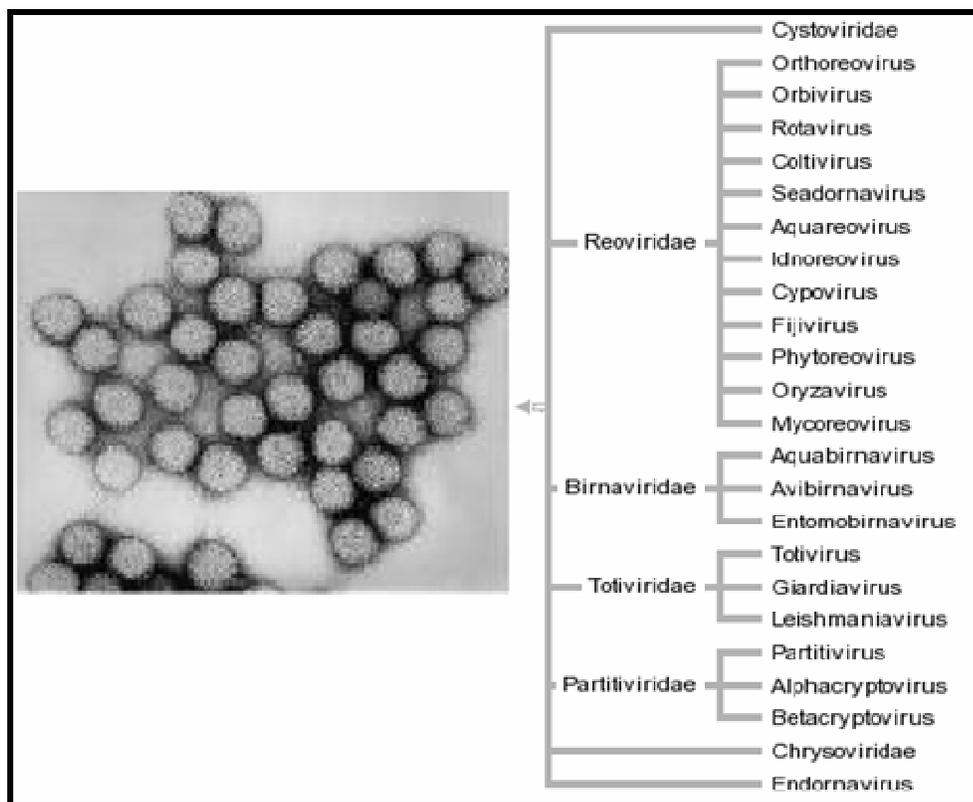


FIGURA 6 - Taxonomia dos RNA de fita dupla, em Famílias e Gêneros, incluindo o Gênero *Orbivirus*.(PALMER, 2006).

Tabela 1- Classificação, propriedades biológicas e localização das proteínas virais pertencentes ao VLA (MERTENS et al., 2007 a) adaptado.

Segmento RNA	ORFs	Nomenclatura	Localização e posição no genoma	Função biológica
Segmento 1	12-3917	VP-1 polimerase viral	Inserida ao sub-core interno, relacionada ao genoma	RNA-dependente RNA polimerase viral
Segmento 2	20-2887	VP-2	Capsídeo interno	Trímeros protéicos, especificidade de sorotipos (24), adsorção viral, epítomos neutralizantes, "in vivo" possui determinantes de virulência.
Segmento 3	18-2720	VP-3	Capsídeo interno	Controla a organização do capsídeo, mantém a estrutura.
Segmento 4	8-1940	VP-4	Inserido sub-core	Transmetilação
Segmento 5	35-1690	NS-1	Formações citoplasmáticas	Sintetizada durante o ciclo replicação viral
Segmento 6	30-1607	VP-5	Capsídeo externo	Reconhecimento celular, internalização
Segmento 7	18-1064	VP-7	Membrana mais externa do capsídeo externo	Envolvimento na infecção de vetores, vírus neutralização, epítomo viral mais imunogênico
Segmento 8	20-1090	NS-2	Inclusões citoplasmáticas	Estabilidade das fitas de RNA
Segmento 9	16-1002	VP-6	Sub-core	Ligação fita simples de RNA com helicase
Segmento 10	20-706 59-706	NS-3 NS-3 ^a	Membranas celulares	Glicoproteínas ligadas a saída da partícula viral.

São conhecidos 24 sorotipos (Figura 7) (FENNER et al.,1993), transmitidos principalmente por um inseto do gênero *Culicoides* (RONDEROS et al., 2003) “mosquito pólvora”, mas também foi isolado de moscas de ovinos (*Melophagus ovinus*) e piolhos de bovinos (*Haematopinus eurysternus*) (HOURRIGAN; KLINGSPORN, 1975).

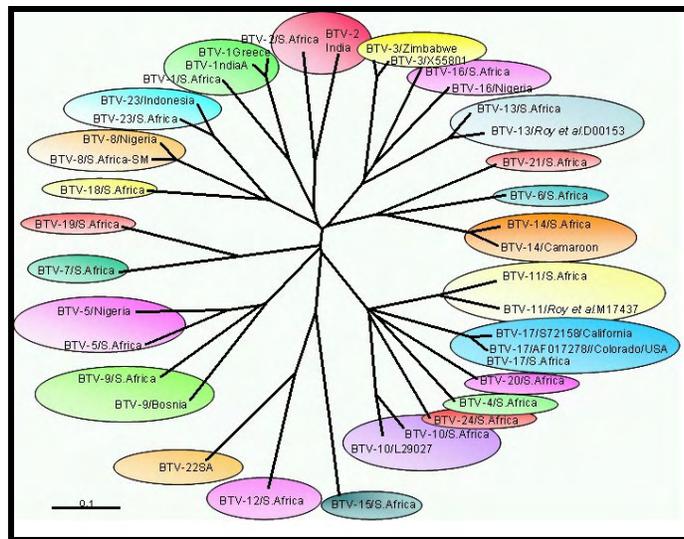


FIGURA 7 – Árvore filogenética dos 24 sorotipos do VLA (MERTENS et al, 2007 b) .

EM 1952, foi a primeira vez em que o vírus foi isolado na América do Norte (McKERCHER et al. 1953)

Os sorotipos 2, 10, 11, 13, e 17 já foram identificados nos E.U.A. (GIBBS et al., 1983). O sorotipo 11, no Canadá (CLAVIJO et al. 2000). Em 1986, na região do Caribe e América Central, identificaram sorotipos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 14 e 17 (CLAVIJO et al., 2002).

Informações sobre os sorotipos predominante do VLA presentes na América do Sul é limitada. Em 1980, o sorotipo 4 foi isolado de touros Brasileiros mantidos em quarentena nos E.U.A. (GROOCOCK; CAMPBELL 1982). Em 2001 Clavijo et al. isolou o sorotipo 12 utilizando RT – PCR e VN , a partir de um surto clinico em ovelhas criadas na região de Curitiba, Paraná (CLAVIJO et al., 2002) . Essa propriedade criava ovinos, caprinos, bovinos e ruminantes selvagens já haviam sido vistos na fazenda. Os sinais clínicos nos ovinos além da temperatura de 39,5°C a 40,8°C incluíam depressão, hiperemia da cavidade oral e edema facial, especialmente sobre os lábios, língua, focinho e no espaço submandibular. Alguns animais apresentaram lacrimejamento e descarga nasal serosa que, em outros, se tinha tornado mucopurulento. Necrose do epitélio do nariz e ponta da língua também foi visto. Não se sabe, se esse sorotipo já estava presente na região ou se foi introduzido.

O VLA depende dos vetores dípteros do gênero *Culicoides* (Figura 8) para se manter na natureza, sendo as condições de temperatura e umidade, na grande parte do nosso país, fatores que favorecem a multiplicação e manutenção dos mesmos, caracterizando a endemia.

O VLA tem sido encontrado em várias partes do mundo, incluindo África, Europa, Oriente Médio, Austrália, Pacífico Sul, América do Norte e Sul, e partes da Ásia. Sua distribuição esta geralmente limitada em países localizados nas áreas tropicais e subtropicais estando compreendida nas latitudes entre 50°N e 34°S, porém dados recentes demonstram que está expandindo para o hemisfério norte (OIE, 2007).



FIGURA 8 - Demonstração do vetor *Culicoides* sp se alimentando durante a fase reprodutiva das fêmeas. (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH, 2008 d)

Cerca de 1247 espécies de *Culicoides* já foram identificadas (BORKENT; WIRTH, 1997), mas apenas 17 estão relacionadas com a transmissão do VLA (MELLOR, 1990). As principais espécies transmissoras do VLA são *C. actoni* Smith e *C. fulvus* Sen Das Gupta (Austrália, leste e sudeste da Ásia), *C. brevitarsis* Kieffer e *C. wadai* Kitaoka (Austrália e sudeste da Ásia) e *C. imicola* Kieffer (África, países do mediterrâneo, sul e leste da Ásia). Na América do Norte o principal vetor é *C. variipennis* (Coquillett). Na América Central e América do Sul, *C. insignis* Lutz e *C. pusillus* Lutz parecem ser os principais vetores competentes do VLA (SAENZ; GREINER, 1994; WIRTH; DYCE, 1985), sendo que os sorotipos 2, 3 e 6 já foram isolados a partir de *C. insignis*, e os sorotipos 3 e 4 a partir do *C. pusillus* (GREINER et al, 1985; MO et al, 1994).

Os *Culicoides* adquirem o BTV após a ingestão de sangue contendo vírus. Este vai se adsorver na parede do intestino médio do mosquito, e se multiplicará neste e em outros tecidos do inseto, incluindo as glândulas salivares, podendo ser transmitido a um ruminante suscetível quando o inseto se alimentar novamente.

Apenas as fêmeas de *Culicoides* são hematófagas e requerem pelo menos um repasto sangüíneo para a conclusão de um ciclo ovariano. Dessa forma, o pico de atividade desses insetos está relacionado com seu ciclo reprodutivo. A alimentação ocorre no período noturno e as temperaturas ótimas para a atividade estão entre 13 e 35°C, sendo que temperaturas elevadas diminuem o tempo necessário para a conclusão de um ciclo ovariano e, por conseguinte, aumentam a freqüência de alimentação. Esta temperatura elevada também é fator necessário para eclosão dos ovos.

Diante destas características do inseto o clima representa o principal fator de risco, já que os *Culicoides* requerem calor e umidade, para se reproduzirem, bem como clima úmido quente e calmo, para se alimentarem. Altas temperaturas favorecem a reprodução do vetor, as excessivamente altas podem reduzir a sobrevivência de vetores adultos (WARD; THURMOND, 1995). Já às temperaturas altas são mais significativas como determinante da distribuição mundial do vetor, sendo estes encontrados, principalmente, em países de clima tropical e sub-tropical (GIBBS; GREINER, 1994).

Os *Culicoides* se multiplicam em regiões alagadas com alta concentração de matéria orgânica ou em águas limpas. São áreas de eleição

para a reprodução desses vetores: áreas pantanosas, terreno irrigado, cocho, cavidades de árvores, frutas em putrefação, solo úmido, áreas lamacentas e áreas de escoamento fecal ao redor das fazendas (existem algumas espécies de *Culicoides* que se reproduzem apenas em esterco bovino e possuem preferência em se alimentarem nessa espécie animal). Dessa forma, a umidade influencia na distribuição das espécies do inseto por meio do efeito na disponibilidade de locais adequados para a reprodução (LOBATO, 1999) e também na multiplicação deste vetor.

Assim, estações do ano, como o verão, favorecem a reprodução e a atividade dos *Culicoides* e, conseqüentemente, a maior transmissão do BTV; de outro modo, sua população tende a reduzir no final do outono e inverno quando a temperatura e a umidade são mais baixas, sendo a Língua Azul de caráter sazonal em muitas regiões (GIBBS; GREINER, 1994; WARD, 1996; LOBATO, 1999).

Outro fator climático que influencia na dispersão aérea dos *Culicoides* é a velocidade e direção dos ventos, estudos mostraram que algumas espécies podem ser carregadas pelo vento por 5 a 6 km de distância.

A epidemiologia da Língua Azul consiste em uma interação complexa e dinâmica envolvendo o hospedeiro, os diferentes sorotipos virais, os vetores, o clima e suas interrelações. Dessa forma, a distribuição do BTV está restrita às áreas onde estão presentes espécies competentes do vetor e número suficiente de hospedeiros susceptíveis, e a transmissão da doença está limitada ao período do ano em que as condições climáticas favorecem o

aumento da população do vetor e a atividade (vôo e repasto sangüíneo) dos insetos adultos (MELLOR, 1996; WARD et al., 1994; WARD; THURMOND, 1995; WITTMANN; BAYLIS, 2000).

Devido à variação entre hábitos alimentares, preferência por hospedeiros e competência na transmissão da doença entre as diferentes espécies de *Culicoides*, os bovinos, por apresentarem uma viremia prolongada funcionam como reservatório do vírus, durante as estações mais frias, onde o número de vetores é menor (GIBBS; GREINER, 1988).

A transmissão venérea por meio de sêmen contaminado e transmissão congênita do VLA podem ocorrer em ruminantes (MICHELSEN, 1990; FENNER et al.,1993), mas o risco é bem menor quando comparado a importação de animais vivos, pois o vírus só é eliminado no sêmen temporariamente, durante o período de viremia (ROBERTS et al., 1993). O vírus não é encontrado no espermatozóide, mas foi isolado de testículo, epidídimo, vesícula seminal, glândula bulbouretral e próstata durante a viremia, fato ainda não elucidado pela literatura (OSBURN, 1994), sendo a sua presença provavelmente associada com traços de sangue infectado com o vírus, proveniente do trato genital.

O vírus é inativado a 50°C/3horas; 60°C/15 min. por β -propiolactona, pelos desinfetantes iodóforos e compostos fenólicos, sensível ao pH<6,0 e >8,0 e muito estável em presença de proteína (WALTON,1980).

O levantamento da prevalência de anticorpos para esta enfermidade tem importância epidemiológica para esta região, em decorrência da crescente

expansão da criação de ovinos e das condições climáticas favoráveis à multiplicação e disseminação dos mosquitos *Culicoides*. Nogueira e Nogueira Júnior (2005) demonstram que o plantel de ovinos do Estado de São Paulo está concentrado nos Escritórios de Desenvolvimento Regionais (EDRs) de Marília, Araçatuba, São José do Rio Preto, Botucatu e Andradina. Por fim, o conhecimento da situação da infecção contribuirá para uma gestão sanitária adequada, e para demonstrar transparência da real situação da distribuição do VLA em nosso território.

Testes sorológicos têm exercido um importante papel na determinação e no conhecimento da distribuição da infecção. A sorologia pode ser utilizada para confirmar a infecção pelo vírus, porém em áreas endêmicas é difícil determinar a significância de um resultado positivo, sem o uso da sorologia pareada ou outros testes complementares (LOBATO, 1999).

Vários testes de diagnóstico são utilizados para avaliar a infecção de ruminantes pelo VLA, incluindo a pesquisa direta do vírus por isolamento viral (IV) e PCR e para pesquisa de anticorpos vírus-neutralização (VN), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), e ELISA C.

O IV é o teste prescrito para revelar infecção recente pelo VLA, considerando o período de viremia que em bovinos pode chegar a 70 dias e em ovinos de 14 a 28 dias (FENNER et al., 1993). No entanto, devido à duração limitada de circulação de vírus, este teste muitas vezes pode produzir resultados falso-negativos (AFSHAR, 1994). Já o PCR identifica ácidos nucleicos viral por até seis meses pós infecção, esta alta sensibilidade pode

identificar mais precocemente os animais expostos comparado ao IV (MACLACHLAN et al., 1994).

A VN detecta sorotipo específico e é geralmente considerada como teste para detecção de anticorpos sorotipo específico (JOCHIM, 1985). Este teste é altamente específico e moderadamente sensível, podendo ocorrer reações cruzadas entre os sorotipos (THOMAS, 1985).

Os primeiros ensaios sorológicos foram realizados pelas técnicas de inibição da hemaglutinação (HI), hemólise em gel e reação de imunofluorescência indireta (RIFID) (WALTON, 1980).

Entre os anos de 1968 a 1980 o teste empregado para diagnóstico e qualificação de animais para exportação era o de Fixação de Complemento (FC). A partir de então, a reação de FC vem sendo substituída pelo teste de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (LOBATO, 1999), sendo o método mais utilizado para detecção de anticorpo (PEARSON; JOCHIM, 1979).

A prova de IDGA não é quantitativa, possui baixa sensibilidade e especificidade bem como sua interpretação subjetiva (AFSHAR et al, 1987; WARD et al., 1995). A razão para isso, resume-se nas reações cruzadas com outros Orbivirus (DELLA-PORTA et al.,1985) e a identificação de anticorpos contra proteínas do grupo dos Vírus da Língua Azul (VLA), não sendo possível identificar qual é o sorotipo envolvido (LOBATO, 1999).

Já o ELISA - CFS, produzido com AcM sorogrupo específico, prescrito pela OIE, está progressivamente substituindo o teste de IDGA e utilizado como teste confirmatório para movimentação de animais (OIE, 2008).

Reddington et al. (1991), concluíram que a sensibilidade do ELISA competitivo (ELISA-C) é comparável a do Western Blotting (WB), da técnica de Rádio Imuno-precipitação (RIP) e da Soro-neutralização (SN), esses três métodos são métodos altamente sensíveis e específicos para a detecção de anticorpos anti-polipeptídeos virais específicos, mas, por serem muito trabalhosos, eles não são apropriados para o uso de diagnóstico de rotina.

Afshar et al. (1987) comparou o ELISA competitivo (ELISA-C) e o ELISA indireto (ELISA-I) para a detecção de anticorpos anti-VLA, sendo que o ELISA-C mostrou-se mais sensível na detecção de anticorpos que o ELISA-I.

Recentemente a utilização de anticorpo monoclonal em kits de ELISA-C demonstrou alta sensibilidade e especificidade para detectar anticorpo para o VLA (SHRINGI; SHRINGI, 2005). O teste baseia-se na utilização de anticorpo monoclonal anti-VP7, que por um ensaio competitivo quantifica nos soros dos animais testados anticorpos vírus neutralizantes, direcionados a VP7 (MARTYN et al., 1990).

Até o momento, não havia relatos da ocorrência de LA em ovinos da região de Araçatuba e Andradina. Poucos estudos em ovinos estão disponíveis no Brasil.

No Brasil, o único dado utilizando o ELISA para detecção de anticorpo contra o VLA, foi Pandolfi (1999), que detectou através do ELISA competitivo a ocorrência de sorologia positiva em 87% (54/62) dos ovinos testados pertencentes ao rebanho da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária do Campus de Jaboticabal – UNESP.

Por outro lado com IDGA, alguns autores como Cunha et al. (1988), examinaram 66 soros de ovinos provenientes de 11 municípios do Estado do RJ, obtendo 24,24% (16/66) de positividade. Arita et al. (1992) examinou 72 soros de ovinos de São Paulo, obtendo uma positividade de 52,7% (38/72). Lobato et al. (2001) realizaram um levantamento em propriedades de caprinos e ovinos no Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri em MG, indicando que 61,8% (389/628) dos ovinos foram soropositivos para LA. Costa et al.(2006) nas mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul, utilizaram a técnica de IDGA em ovinos, obtendo a prevalência de 0,16% para LA (2/1331)

Diante da escassez de informações sobre a prevalência de anticorpos anti-VLA no Estado de São Paulo, e em virtude da crescente organização do setor produtivo na ovinocultura, a presente investigação visa consolidar a parceria Universidade e órgãos reguladores oficiais na certeza de colaborar com programas sanitários mais sólidos. Neste sentido, os principais objetivos foram:

1. Determinar, na região de Araçatuba-SP, a prevalência da Língua Azul em ovinos na fase reprodutiva, utilizando os teste de IDGA e ELISA – C;
2. Correlacionar os resultados obtidos pelos métodos de diagnóstico IDGA e ELISA CFS;

REFERÊNCIAS

Segundo normas da ABNT-NR 6023

AFSHAR, A. Bluetongue: laboratory diagnosis. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v.17,n 3-4, p.221 – 242, 1994.

AFSHAR, A.; THOMAS, F. C.; WRIGHT, P. F.; SHAPIRO, J. L.; SHETTIGARA, P. T.; ANDERSON, J. Comparison of competitive and indirect Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, n.9, p.1705-1710, 1987.

ARITA, G. M.; GATTI, M. S.; GERMANO, P. M.; PESTANA-DE-CASTRO, A. F. Comparison of indirect immunofluorescence with agar gel immunodiffusion for the diagnosis of bluetongue virus infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 25, n.5, p. 503-508, 1992.

BORKENT, A.; WIRTH, W. W. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* n.233, p. 5-257, 1997.

CLAVIJO, A.; HECKERT, R.; DULAC, G.; AFSHAR, A. Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of Virological Methods* v.87, n.1-2, p.13-23, 2000.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J. W. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Veterinary Record*, v.151, n.10, p.301-302, 2002.

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

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

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

DELLA-PORTA, A. J.; PARSONSOSN, I. M.; MCPHEE, D. A. problems in the interpretation of diagnostic tests due to cross-reactions between orbiviruses and broad serological responses in animals. In: BARBERT, T. L.; JOCHIM, M. M.(eds) *Bluetongue and related orbiviruses*. New York: Liss, 1985. p. 445-453.

DUTOIT, R. M. The transmission of bluetongue and horse sickness by Culicoides. Onderstepoort. *American Journal of Veterinary Research*, v.19, p.7-16, 1944.

ERASMUS, B. J. Bluetongue in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, v.51, n.4 p.165 - 170, 1975.

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

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

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

GIBBS, E. P. J.; GREINER, E. C. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. In:*The Arboviruses: epidemiology and ecology*, CRC Press, Boca Raton v.2, p.39-70, 1988.

GIBBS, E. P. J.; GREINER, E. C. The Epidemiology of Bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* v.17, n.3 - 4, p. 207-220, 1994.

GIBBS, E. P. J., GREINER, E. C., TAYLOR, W. P. Isolation of bluetongue virus serotype 2 from cattle in Florida: serotype of bluetongue virus hitherto unrecognized in the western hemisphere. *American Journal of Veterinary Research*. v.44, n.12, p.2226-2228, 1983.

GORCHS, C.; LAGER, I. Lengua Azul Actualizacion sobre el agente y la enfermedad. *Revista Argentina Microbiologia*, v.33, n.2, p.122-132, 2001.

GREINER, E. C.; BARBER, T. L.; PEARSON, J. E.; KRAMER, W. L.; GIBBS, E. P. J. Orbiviruses from Culicoides in Florida. In:BARBER,T. L.; JOCHIM M. M. New York: A.R. Liss, p.195 - 200, 1985.

GROOCOCK, C. M.; CAMPBELL, C. H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v.46, n.2, p.160-164, 1982

HOURRIGAN, J. L.; KLINGSPORN, A. L. Epizootiology of bluetongue: the situation in the United States of America. *Australian Veterinary Journal*,v.51, n.4, p.203-208, 1975.

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

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA.2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=21&i=P>> Acesso em 02 abr 2008

INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH. Disponível em: <http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins/_/disease%20symptomsBT-Mild.ppt> Acesso em 3 jun. 2008 (a)

INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH. Disponível em <http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins/_/disease%20symptomsBT-Moderate.ppt> Acesso em 3 jun. 2008 (b)

INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH. Disponível em <http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins//disease%20symptomsBT-Severe.ppt> Acesso em 3 jun. 2008 (c)

INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH. Disponível em <<http://www.iah.ac.uk/disease/images/Two-midges,-one-engorged-with-blood.jpg>> Acesso em 10 out. 2008 (d)

JOCHIM, M.M. An overview of diagnostics for bluetongue. *Prog. Clin. Biol. Res.* v.178, p.423- 433, 1985.

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

KONRAD, P. A.; RODRIGUES, R. O.; CHAGAS, A. C. P.; PAZ, G. F.; LEITE, R. C. Anticorpos contra o vírus da Língua Azul em bovinos Leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. *Revista da Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, v.10, n.1, p.117-125,2003.

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

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

MACLACHLAN, N. J., NUNAMAKER, R. A., KATZ, J. B., SAWYER, M. M., AKITA, G. Y., OSBURN, B. I., TABACHNICK, W. J. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR

assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Archives of Virology*. v.136, n.1-2, p. 1 - 8, 1994.

MARTYN, J. C.; GOULD, A. R.; EATON, B. T. High level expression of the major core protein VP7 and non structural protein NS3 of BTV in Yeast: use of expressed VP7 as diagnostic group reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Research*, v.18, n.2-3, p. 165 - 178, 1991.

MCKERCHER, D. G.; MCGOWAN, B.; HOWATH, J. A.; SAITO, J. K. A preliminary report on the isolation and identification of bluetongue virus from sheep in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.122, p.300 - 301, 1953.

MELLOR, P. S. *Culicoides*: vectors, climate change and disease risk. *Veterinary Bulletin*, v.66, p.301-306, 1996.

MELLOR, P. S. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.162, p.143-161, 1990.

MERTENS, P.P.C.; ATTOUI, H.; BAMFORD, D. H. The RNAs and proteins of dsRNA Viruses. Disponível em <http://www.reoviridae.org/dsRNAvirus_proteins/BTVhtm> Acesso em 10 out. 2007 a.

MERTENS, P.P.C.; ATTOUI, H.; BAMFORD, D. H. The RNAs and proteins of dsRNA Viruses. Disponível em <http://www.reoviridae.org/dsRNAvirus_proteins/btv-seg-2.htm> Acesso em 10 out. 2007 b .

MICROBIOLOGY BYTES. Disponível em: <<http://microbiologybytes.wordpress.com/2007/09/28/bluetongue-virus/>> Acesso em 5 mai. 2008.

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

MO, C. L.; THOMPSON, L. H.; HOMAN, E. J.; OVIEDO, M. T.; GREINER, E. C.; GONZALES, J.; SÁENS, M. R. Bluetongue virus isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. *American Journal Veterinary Research*, v.55, n.2, p.211-215, 1994.

NOGUEIRA, E. A., NOGUEIRA JUNIOR, S. Ovinos e Caprinos avançam em São Paulo. 06/12/2005 Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136>> Acesso em 10 jan. 2008.

OIE Manual of Diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.9. Bluetongue virus. 2007. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00032.htm> Acesso em 24 jan. 2008.

OSBURN, B. I. Bluetongue virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.10, n.3, p.547-560, 1994.

PALMER, E. Double – stranded RNA viruses. 05/02/2006. Disponível em: <<http://www.tolweb.org/doublé-strand-RNA-viruses/21833>> Acesso em 21 fev 2006

PANDOLFI, J. R. C. *Língua azul e doença hemorrágica epizoótica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres*. Jaboticabal, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP Jaboticabal, São Paulo.

PARSONSON, I. M. Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.162, p.119-141, 1990

PEARSON, J. E.; JOCHIM, M. M., Protocol for the immunodiffusion test for bluetongue. *Proceedings American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*,v.22, p.463-475, 1979.

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

REDDINGTON, J. J.; REDDINGTON, G. M.; MACLACHLAN, N. J. Competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.3, n.2, p.144-147, 1991.

ROBERTS, D. H.; LUCAS, M. H.; BELL, R. A. Animal and animal product importation and assessment of risk from bluetongue and other ruminant orbiviruses. *British Veterinary Journal*, v.149, n.1, p.87-99, 1993

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

SAENZ, M. R.; GREINER, E. C. *Culicoides* aspirated from cattle in Costa Rica, Honduras, Panama and Puerto Rico, and their role as potential vectors of bluetongue viruses. *Medical and Veterinary Entomology*, v.8, n.1, p.15-19, 1994.

SARAIVA, K. F. *Inferência bayesiana para teste diagnóstico*. São Carlos, 2004. 200p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

SHRINGI, S.; SHIRINGI, B. N. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies breeds of

sheep and goats in Rajasthan, India. *Journal of Veterinary Science*, v.6, n.1, p.77-79, 2005.

SINGER, R. S.; BOYCE, W. M.; GARDNER, I. A.; JOHNSON, W.O.; FISHER, A.S. Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 35, n.4, p. 265-282, 1998.

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

SIQUEIRA, E.R. Cria e recria de cordeiros em confinamento. In:____.Nutrição de ovinos. Jaboticabal: FUNEP – FCAJ – UNESP,1996. p.175-212.

SORIO, A. *Mercado de carne de caprinos e ovinos*. 2005. Disponível em: <www.caroata.com.br>. Acesso em: 28 maio 2008.

THEILER, A. Bluetongue in sheep. In: TRANSVAAL. *Directory of Agriculture Annual Report for 1904-5*. p. 110, 1906.

VIPERDB virus particle explorer. Disponível em: <http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=2btv> Acesso em 10 out. 2007.

WALTON, T. E. The diagnosis and control of bluetongue. *Bulletin of the International des Epizootics*, v.92, n.7-8, p.512-523,1980.

WARD, M. P. Seasonality of infection of cattle with bluetongue viruses. *Preventive Veterinary Medicine*, v.26, n.2, p.133-141, 1996.

WARD, M. P.; THURMOND, M. C. Climatic factors associated with risks of seroconversion of cattle to bluetongue viruses in Queensland. *Preventive Veterinary Medicine*, v.24, n.2, p.129-136, 1995.

WARD, M. P.; CARPENTER, T. E.; OSBURN, B. I. Host factors affecting seroprevalence of bluetongue virus infections of cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v.55, n.7, p.916-920, 1994.

WIRTH, W. W.; DYCE A. L. The current taxonomic status of the Culicoides vectors of bluetongue viruses. Orbiviruses from Culicoides in Florida. In: BARBER, T. L.; JOCHIM M. M. *Bluetongue and related orboviruses*. New York: A.R. Liss, p.151 - 164, 1985.

WITTMANN, E. T.; BAYLIS, M. Climate change: effects on Culicoides – transmitted viruses and implication for UK. *Veterinary Journal*, v.160, n.2, p.107-117, 2000.

CAPÍTULO 2

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

RESUMO - A língua azul é uma doença viral, cujo agente etiológico pertence à família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus*, transmitida por um vetor (artrópode) hematófago, do gênero *Culicoides*. Por se tratar de doença confundível com Febre Aftosa está incluída na lista de diagnóstico diferencial juntamente com Estomatite Vesicular, Varíola Ovina, Ectima Contagioso. O estudo teve como objetivo detectar a presença de anticorpos para língua azul em ovinos da região de Araçatuba, por ser esta uma região com rebanho expressivo e condições climáticas favoráveis à multiplicação de insetos. As amostras foram colhidas ao longo do ano de 2006, de ovinos adultos, em fase reprodutiva, (acima de 12 meses e com pelo menos uma parição, ou em caso de machos sexualmente maduros) e sem sintomas característicos da doença, de ambos os sexos, cadastrados no Núcleo de Produtores de Ovinos da Região de Araçatuba, distribuídas nos municípios da Região administrativa de Araçatuba. O tamanho da amostras foi calculado, considerando-se distribuição normal, prevalência de 50%, nível de confiança de 95% e precisão absoluta de 3%. Foram analisadas 1002 amostras de soros ovinos adultos, provenientes de 31 cabanhas, pelas provas de imunodifusão dupla em gel de agar (IDGA) e ELISA (Enzyme Linked immunosorbent Assay) de competição da fase sólida (ELISA CFS), provenientes do Centro Panamericano de Febre aftosa. Dessas amostras, 743 (74,3%) foram reagentes ao vírus da língua azul, pelo teste de ELISA–CFS e 651 (65,1%), pela técnica de IDGA. Não houve associação significativa entre prevalência da doença e o sexo dos animais. Esses resultados revelam que o Vírus da Língua Azul encontra-se disseminado nessas regiões, sugerindo a ocorrência de infecções inaparente.

Palavras chave: diagnóstico, IDGA, ELISA, inquérito soropidemiológico

SUMMARY - Bluetongue (BT) is an infectious, non-contagious, insect-borne viral disease of Ruminants. The causative agent of BT is bluetongue virus (BTV) that belongs to the family *Reoviridae* genus *Orbivirus*. Insect vectors in the genus *Culicoides* transmit this virus. BT affects domestic and wild ruminants, however small ruminants are considered the most affected species. BT is included in the OIE list based on the differential diagnosis with Foot and Mouth Disease (FMDV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Sheep Pox Virus (SPV). The aim of the study was to detect antibodies against BTV in commercial sheep farms, of the Northeastern region of Sao Paulo State, Brazil. The size of the samples was calculated, considering normal distribution, prevalence of 50%, confidence level of 95% and absolute precision of 3%. A total of 1002 sera samples collected from adult sheep (above 1 year-old), comprising a total of 31 farms, were screened for the presence of BTV antibodies, by agar gel immunodiffusion test (AGID) and ELISA-CFS (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – competitive solid phase), both produced by Pan American Center of FMDV. From a total of 743 samples 74,3% were positive by ELISA – CFS and 651 (65.1%) were positive by AGID. There was no significant association between prevalence of the disease and sex of animals. These results suggest that the BTV is widespread among farms, probably causing subclinical infections, with high level of antibodies.

Keywords: diagnoses, AGID, ELISA-CFS, seroepidemiological survey

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

Ruminantes são susceptíveis ao vírus causador da LA, em geral a infecção ocorre de forma não aparente, com exceção dos ovinos, que manifestam sinais evidentes, com diminuição na produção e mortalidade elevada (LOBATO, 1999). Segundo ERASMUS (1975) os sinais observados com mais frequência são edema facial, erosão e ulceração do trato gastro intestinal, coronite com conseqüente claudicação e febre alta. Dessa forma, alguns destes sinais clínicos podem ser confundidos com febre aftosa, febre catarral maligna, dermatite pustular contagiosa, poxvirus, doença da fronteira, “foot root” e actinobacilose sendo, portanto o diagnóstico diferencial de fundamental importância. O controle destas doenças, bem como seu diagnóstico é fundamental em virtude das barreiras sanitárias impostas ao Brasil, devido a existência destas a exemplo do ocorrido com Febre Aftosa nos Estados do Mato Grosso e Paraná.

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

São conhecidos 24 sorotipos (FENNER *et al.*,1993), transmitidos principalmente por um inseto do gênero *Culicoides* (RONDEROS *et al.*, 2003) “mosquito pólvora”, mas também foi isolado de moscas de ovinos (*Melophagus ovinus*) e piolhos de bovinos (*Haematopinus eurysternus*) (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1975). O VLA depende dos mosquitos vetores para se manter na natureza sendo as condições de temperatura e umidade, na grande parte do nosso país, fatores que favorecem a multiplicação e manutenção dos mesmos, caracterizando a endemia. As mudanças climáticas em regiões limítrofes de endemias, movimentação de animais, mudança nas características da estação chuvosa e, principalmente, movimento dos ventos que podem trazer os vetores de regiões distantes para áreas livres da doença (LOBATO, 1999), como o ocorrido no surto da Inglaterra em 2006.

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

Com o objetivo de verificar anticorpos para esta enfermidade nos ovinos dos municípios pertencentes à Região Administrativa (RA) de Araçatuba, foram realizados os testes de IDGA e ELISA – CFS, a escolha da região ocorreu devido à crescente expansão da ovinocultura e das condições climáticas

favoráveis à multiplicação e disseminação dos mosquitos *Culicoides*. NOGUEIRA & JUNIOR (2005) demonstram que o plantel de ovinos do Estado de São Paulo está concentrado nos Escritórios de Desenvolvimento Regionais (EDRs) de Marília, Araçatuba, São José do Rio Preto, Botucatu e Andradina, e que Araçatuba detém o segundo maior rebanho desse Estado (IBGE, 2008). O conhecimento da situação da infecção contribuirá para implementação de medidas sanitárias adequadas a região.

MATERIAL E MÉTODOS

Região de estudo e amostragem

A região escolhida foi Araçatuba, incluindo a área urbana e rural, com 470km², (latitude 21°11'50'', longitude 50°25'52''). O clima é semi-árido, com chuvas localizadas no verão e um inverno extremamente seco, umidade relativa do ar de 37%, calculada em 2007. O número de animais em manejo de criação comercial no Brasil é de aproximadamente 16.019.170 animais cadastrados, dos quais 664.422 pertencentes ao rebanho da região sudeste (IBGE, 2008). Este número representa aproximadamente 4% do rebanho nacional, sendo a região mais produtora o município de São José do Rio Preto, representando 20% e em segundo lugar a cidade de Araçatuba e região, com 12%.

As amostras foram colhidas ao longo do ano de 2006, de ovinos adultos, em fase reprodutiva, (acima de 12 meses e com pelo menos uma parição, ou em caso de machos sexualmente maduros) e sem sintomas característicos da

doença, de ambos os sexos, cadastrados no Núcleo de Produtores de Ovinos da Região de Araçatuba, distribuídas nos municípios da RA de Araçatuba.

O tamanho da amostras foi calculado, considerando-se distribuição normal, prevalência de 50%, nível de confiança de 95% e precisão absoluta de 3%.

A amostragem das propriedades foi realizada por sorteio e a seleção dos animais das propriedades foi realizada aleatoriamente, coletando-se 20% do número total de reprodutores.

Obtenção das amostras

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

Detecção de anticorpos para o Vírus da Língua Azul (VLA)

As amostras foram submetidas aos testes de imunodifusão dupla em gel de agar (IDGA) e ELISA (Enzyme Linked immunosorbent Assay) competitivo em fase sólida (ELISA CFS), adquiridos do Centro Panamericano de Febre Aftosa e realizados segundo protocolo do fabricante. Os ensaios foram

realizados no Laboratório de Viroses dos Bovídeos do Instituto Biológico – SP. Vale ressaltar, que o diagnóstico desta enfermidade deve ser realizado por laboratórios habilitados pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento. Todos os procedimentos adotados seguiram as recomendações da OIE.

Análise estatística

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

A correlação entre as técnicas de ELISA-C e IDGA foi determinada pelo coeficiente kappa (THRUSFIELD, 2004), sendo os dois testes aceitos internacionalmente para pesquisa de anticorpos contra o vírus da LA.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que 74,3% (744/1002) dos animais testados possuem anticorpos para o VLA pelo ELISA CFS, e 65% (651/1002) apresentaram reatividade positiva para os *Orbivirus* pela técnica de IDGA (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da freqüência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos empregados.

		IDGA		
		Positivo	Negativo	
ELISA CFS	Positivo	651	93	744
	Negativo	0	258	258
	Total	651	351	1002

A concordância observada entre os resultados dos testes foi de 0,907 para uma concordância esperada de 0,573, dando um índice *kappa* de 0,783, demonstrando uma concordância substancial.

Apesar da menor especificidade do IDGA (detecta outros *orbivirus*), as análises do nosso trabalho revelaram menor número de animais reagentes. Dos 1002 animais testados os 651 positivos no IDGA foram confirmados pelo ELISA, revelando que não houve reação cruzada com outros *orbivirus*. Mesmo com as desvantagens da falta de especificidade e subjetividade, o teste de IDGA, desde 1982, tem sido o procedimento prescrito pela OIE para controlar o movimento internacional de ruminantes. Contudo atualmente para diagnóstico confirmatório, a OIE recomenda que os soros positivos por IDGA devam ser retestados utilizando um teste específico, sendo a técnica preferida ELISA de competição. Vale salientar que o ELISA CFS revelou, além dos 651 animais reagentes no IDGA, outros 93. Este fato pode ser explicado pela maior sensibilidade do teste.

Em todas as 31 cabanhas foram identificados ovinos soropositivos (Gráficos 1 e 2), indicando que o agente esta amplamente disseminado nessa região.

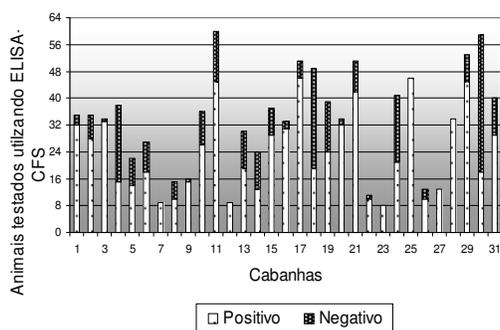


Figura 1 - A

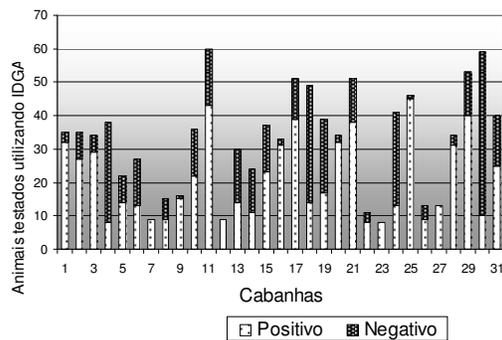


Figura 1 - B

Figura 1 - Número de ovinos reagentes e não reagentes por cabanhas ao teste ELISA-CFS (A) e ao teste de IDGA (B) na Região de Araçatuba – SP.

Uma das explicações para o elevado número de animais soropositivos pode ser devido ao fato do clima da região ser propício, com temperaturas entre 13 e 35°C, favoráveis a multiplicação dos *Culicoides*, que requerem calor e umidade, para se reproduzirem, bem como clima úmido quente, para se alimentarem. Essa condição favorável na região estudada ocorre na maior parte do ano, sendo assim, o clima representa o principal fator de risco (WARD & THURMOND, 1995). Outro fator de risco é a presença de grande quantidade de bovinos nessa região, tendo em vista a longa viremia apresentada por esses, atuam como reservatório, propiciando a contaminação dos vetores e transmissão do vírus a outros ruminantes como os ovinos (GORCHS & LAGER, 2001). A viremia em bovinos pode chegar a 70 dias e em ovinos varia de 14 a 28 dias (FENNER *et al.*, 1993).

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre a positividade e o sexo dos animais, conforme demonstra a tabela 2.

Tabela 2- Distribuição da soropositividade para Língua Azul, em relação ao sexo dos animais e as técnicas empregadas.

Variável	Categoria	IDGA						p *
		Positivo		Negativo		Total		
		N	%	N	%	N	%	
Sexo	Fêmea	576	64,5	317	35,5	893	100	0,3737
	Macho	75	68,8	34	31,2	109	100	
	Total	651	65,0	351	35,0	1002		

Variável	Categoria	Elisa						p *
		Positivo		Negativo		Total		
		N	%	N	%	N	%	
Sexo	Fêmea	663	74,2	230	25,8	893	100	0,6911
	Macho	79	72,5	30	27,5	109	100	
	Total	742	74,1	260	25,9	1002		

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

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

No Brasil, o único dado utilizando o ELISA competitivo para detecção de anticorpo contra o VLA, foi PANDOLFI (1999), que detectou através do ELISA competitivo a ocorrência de sorologia positiva em 87% (54/62) dos ovinos testados pertencentes ao rebanho da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária do Campus de Jaboticabal – UNESP.

Por outro lado com IDGA, alguns autores como CUNHA *et al.* (1988), examinaram 66 soros de ovinos provenientes de 11 municípios do Estado do RJ, obtendo 24,24% (16/66) de positividade. LOBATO *et al.* (2001) realizaram um levantamento em propriedades de caprinos e ovinos no Norte de Minas,

Jequitinhonha e Vale do Mucuri em MG, indicando que 61,8% (389/628) dos ovinos foram soropositivos para LA. COSTA *et al.*(2006) nas mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul, utilizaram a técnica de IDGA em ovinos, obtendo a prevalência de 0,16% para LA (2/1331) .

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

No Brasil pouco se conhece sobre a doença e sorotipos presente, essa carência de dados impede a discussão sobre o uso de vacinas para o controle da doença e dificulta a implementação de medidas seguras para movimentação de animais. Apenas os sorotipos 4 e 12 foram isolados no Brasil, sendo o 4 isolado em Plumb Island, de bovinos exportados para o EUA (CROOCOCK & CAMPBELL, 1982) e o 12 de ovinos provenientes de um surto de LA no Estado do Paraná em 2001 (CLAVIJO *et al*, 2002).

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

Concluindo a prevalência da língua azul na região de Araçatuba foi alta, tanto quando avaliada pelo IDGA (65%) quanto pelo ELISA teste (74,3%).

Houve correlação substancial quando comparados os resultados obtidos pelos dois métodos. Esses resultados apontam para outras necessidades relacionadas à detecção do agente e caracterização do sorotipo. Outros estudos estão sendo realizados, no sentido de suprir essas carências.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio na forma de auxílio à Pesquisa, processo (2006/54397-5) e a FUNDUNESP 00482/07-DFP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLAVIJO,A.; SEPULVEDA,L.; RIVA,J.; PESSOA-SI,M.; TAILOR-RUTHES,A.; LOPEZ,J.W.; Isolation of bluetongue vírus serotype 12 from na outbreak of the disease in South America. **Veterinary Record**, 151, p.301-302, 2002

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

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

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

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

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

FENNER, F. J. *et al.* **Reoviridae in veterinary virology**. 2^a ed. San Diego: Academic Press. 1993. p.537-552.

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

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

GROOCOCK, C.M. & CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of Bluetongue Virus from imported cattle in quarantine. **Canadian Journal Comparative Medicine** v.46, p. 160 – 164, 1982

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

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Disponível em : <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=21&i=P> Acesso em 02/04/2008

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

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

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

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

NOGUEIRA, E. A., JUNIOR,S.N. Ovinos e Caprinos avançam em São Paulo. 06/12/2005 Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136> Acesso em 10/01/2008.

OIE Manual of Diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.9. Bluetongue virus. Disponível em: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00032.htm Acesso em 24/01/2008.

PANDOLFI, J. R. C. Língua Azul e Doença Hemorrágica epizootica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres. Jaboticabal, 1999. 68p Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP Jaboticabal, 1999.

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

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

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

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

THEILER, A. Bluetongue in sheep. In Transvaal. *Directory of Agriculture Annual Report for 1904-5*, pp. 101-121, 1906.

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

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