



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DO VÍRUS DA LÍNGUA
AZUL (BTV) EM REBANHOS CAPRINOS DO ESTADO DA PARAÍBA**

Givanildo Jacinto dos Santos Filho

Areia – PB

2017

Givanildo Jacinto dos Santos Filho

INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (BTV) EM REBANHOS CAPRINOS DO ESTADO DA PARAÍBA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal da Paraíba como requisito básico para a conclusão do Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária.

Orientadora: Suzana Aparecida Costa de Araújo

Areia – PB

2017

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

S237i Santos Filho, Givanildo Jacinto dos.

Investigação soropidemiológica do vírus da língua azul (BTV) em rebanhos caprinos do estado da Paraíba / Givanildo Jacinto dos Santos Filho- Areia: UFPB/CCA, 2017.

27 f.: il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientador (a): Profa. Dra. Suzana da Costa de Araújo.

1. Caprinocultura. 2. Infecções Virais. 3. Sorologia. 4. IDGA. I. Araújo, Suzana da Costa de (Orientadora) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 636.3.09(813.3)

“Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram e me ajudaram em toda a minha trajetória acadêmica, a minha noiva que sempre esteve comigo me dando apoio e força, e a ajuda e companheirismo de todos os amigos”.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente ao Senhor meu Deus, por sua infinita graça, por seu tão grande amor, por nunca desistir de mim, por toda a sabedoria e experiências que tem me proporcionado a cada dia, por toda a saúde e paz que tem me concedido.

Agradeço aos meus pais Givanildo Jacinto dos Santos e Luzinete de Vasconcelos Souza Santos, por todo o esforço que sempre tiveram para me oferecer condições de estudar, por me orientarem a que caminhos deveria trilhar, por me repreender quando não estava fazendo a coisa certa, e por sempre reconhecer o que fiz de bom. Obrigado meus pais, sem sua ajuda não seria possível chegar aqui hoje. Agradeço aos meus irmãos, que muitas vezes sem saber me deram forças para continuar quando já não tinha forças ao me dizerem que um dia gostariam de chegar onde cheguei.

Agradeço a minha linda noiva Daíse Martins, obrigado meu amor por todo apoio, por todas as palavras de conforto, e todo o carinho que você sempre me deu, você nem imagina o quanto tudo isso foi fundamental para que hoje eu pudesse estar aqui.

Agradeço a todos os meus amigos, aqueles que quando eu ainda não tinha onde dormir me abrigaram em seu quarto, Renato, Flaviano, Ronaldo, William. Aqueles que vieram depois e nesses 4 anos tiveram que me aguentar todos os dias como colega de quarto Paulo, Welisson, Junior, Augusto. Aqueles que mesmo distante fazem parte dessa história, Izaque, Audasley, Gilvan, Gleydson, Mateus. Agradeço aqueles que foram os primeiros nesse CCA, e cada um na sua forma contribuíram tanto para que tudo isto se concretizasse, Lucas, Vinícius, Valdemar, bem como todos os demais colegas de sala. Aqueles que vieram quase no final dessa jornada, mas que em pouco tempo, e que fizeram toda a diferença, Priscylla, Candice, Raissa, Mauro, Maylane, Rafaela, Laelia. E a todos os outros meus colegas que de alguma forma contribuíram para esta realização.

Não poderia me esquecer da família ABU, cada um com seu jeito, cada um com uma palavra, pessoas que me inspiraram, pessoas que me apoiaram, pessoas que estarão sempre na minha história, Rayene, Aldeir, João Paulo, Vanessa, Begna, Gisliane, Mayara, Ysa, Pedro, Quênia, Allyson, Felipe Coutinho, Felipe de Melo, Samuel, Líria, As Rebecas, Williames, Robson, Bruno.

Obrigado a todos os professores do CAVN que tanto me ensinaram para que hoje pudesse estar aqui. Obrigado a todos os meus professores do CCA que além dos conhecimentos acadêmicos me ensinaram com suas histórias de vida, com suas conversas fora da sala de aula,

em especial a minha maravilhosa orientadora, a professora Suzana, por cada orientação dada, pela atenção e empenho que sempre teve para comigo, mesmo em poucos dias de convivência foi tão importante nessa jornada; a professora Silvanda que me deu a primeira oportunidade de participar de um projeto nesta instituição; ao professor Danilo, que sempre me deu tantas oportunidades e fez tanto por mim; ao professor Celso que mesmo em pouco tempo de convívio me ensinou tanto, e me estimulou a prosseguir em outros rumos com a sua história de vida. Obrigado também ao professor Felício que em apenas poucos dias de estágio se tornou um amigo e na sua simplicidade me ensinou tanto, sempre disposto a estar me ajudando e orientando no que possível.

Meu muito obrigado a todos!

INVESTIGAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (BTV) EM REBANHOS CAPRINOS DO ESTADO DA PARAÍBA

RESUMO

O rebanho caprino do Brasil em 2015 era de 9.614,722 milhões de cabeças, tendo o estado da Paraíba o 5º (quinto) maior rebanho do país no mesmo ano. Neste cenário, o setor da caprinocultura brasileira desempenha um papel importante no âmbito socioeconômico e na pecuária nacional. Dentre vários agentes etiológicos que acometem caprinos, os vírus merecem destaque, a exemplo do Vírus da Língua Azul (VLA). Devido à escassez de dados que demonstrem a soroprevalência deste microrganismo em rebanhos caprinos no território paraibano, o presente estudo propõe realizar uma análise epidemiológica a fim de estabelecer a soroprevalência do VLA em microrregiões da Paraíba caracterizadas pela criação desses animais. Para tanto, foram coletadas 385 amostras de soro sanguíneo de 8 propriedades distintas, distribuídas nas microrregiões do Cariri, Curimataú e agreste. A pesquisa foi baseada primariamente na detecção de anticorpos contra proteínas virais estruturais, executada por meio do teste de Imunodifusão Dupla em Gel de Agarose (IDGA). Das propriedades, 37,5% (3 do total de 8 propriedades) apresentaram amostras positivas ao teste de IDGA para o VLA, tendo 2,03% (7 do total de 344 amostras de soro) de amostras positivas para anticorpos séricos anti-BTV. Os fatores de risco considerados significantes foram utilizados para as análises univariada e multivariada utilizando o programa EpiInfo™ 7 (versão 7.1.5). A partir destas análises, identificou-se que o fator de maior relevância nos resultados obtidos foi a finalidade de criação dos animais. Os resultados podem ser considerados mínimos para saber qual o real risco da presença do VLA nos rebanhos caprinos no estado da Paraíba, bem como seus impactos reais. Portanto, faz-se mister a realização de novos trabalhos soroe epidemiológicos mais detalhados e aprofundados acerca do presente tema abordado, assim como fatores predisponentes e o uso de técnicas diagnósticas mais avançadas, como a reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e posterior sequenciamento genético.

Palavras – Chave: Caprinocultura, Infecções Virais, Sorologia, IDGA

SERUM INVESTIGATION OF BLUE-TONGUE VIRUS (BTV) EPIDEMIOLOGY IN GOAT HERDS FROM THE STATE OF PARAÍBA

ABSTRACT

The Brazilian goat herd in 2015 was 9.614.722 million heads, having the state of Paraíba the 5th (fifth) largest herd in the country on the same year. In this scenario, the Brazilian goat breeding sector plays an important role in the socioeconomic field and in the national livestock sector. Among several etiological agents that affects goats, the viruses deserve to be highlighted, by example the Bluetongue Virus (BTV). Due to the scarcity of data demonstrating this microorganism seroprevalence in goat herds in Paraíba territory, this study proposes to carry out an epidemiological analysis in order to establish a BTV seroprevalence in Paraíba microregions characterized by the breeding of these animals. For this, 385 blood serum samples were collected from 8 different properties, distributed in the Cariri, Curimatau and harsh microregions. The research was designed to detect antibodies against structuring proteins, by means of the Double Agar Gel Immunodiffusion (DID) test. From the properties, 37.5% (3 of 8 properties) presented positive samples by DID test for BTV, with 2.03% (7 from 344 total serum samples) of positive samples for anti-BTV antibodies. Considered significant risk factors were used for univariate and multivariate analyzes using the EpiInfo™ 7 program (version 7.1.5). By these analyses, it was identified that the greater relevance factor in the results obtained was the animals breeding purpose. The results may be minimal in order to know the real risk of BTV presence in the goat herds in the state of Paraíba, as well as its real impacts. Therefore, it is necessary to carry out new more detailed and in-depth seroepidemiological studies about the present topic, as well as predisposing factors and the use of more advanced diagnostic techniques, as the reverse transcriptase reaction, followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent genetic sequencing.

Keywords: Goat breeding, Viral Infections, Serology, DID

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1 - Estrutura de um Reovírus típico.	10
Figura. 2 – Microscopia Cryo-Eletrônica (Cryo-EM) do BTV	11
Figura. 3 - Ilustração esquemática da estrutura de uma partícula vírica indicando os elementos constituintes.....	12
Figura. 4 - Distribuição geográficas dos municípios onde foram coletadas as amostras.	17
Figura. 5 - Ilustração do ensaio de Imunodifusão de ágar-gel (IDGA).....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela. 1 – Distribuição de prevalência de amostras positivas nas propriedades estudadas... 19

Tabela. 2 – Fatores correlacionados ao aparecimento de anticorpos séricos anti-BTV. 20

SUMÁRIO

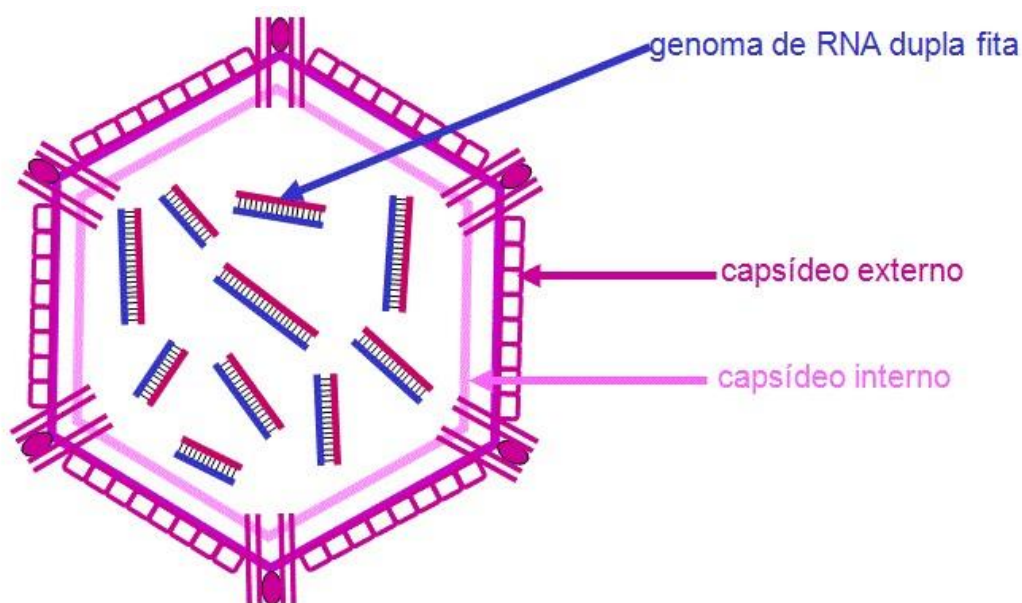
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Orbivírus.....	10
1.2 Transmissão.....	12
1.3 Patogenia e Sinais Clínicos.....	13
1.4 Diagnóstico.....	14
1.5 A caprinocultura no Brasil e na Paraíba.....	14
1.6 O Vírus da Língua Azul no Brasil e no Mundo.....	15
1.7 A problemática.....	16
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E METÓDOS.....	17
3.1 A Área de Estudo.....	17
3.2 Amostragem e Processamento.....	18
3.3 Fatores Analisados.....	19
3.4 Análises Estatísticas.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSÕES.....	19
5. CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

1.1 Orbivírus

O gênero *Orbivírus* é um dos 11 gêneros da família *Reoviridae* uma das maiores famílias de vírus. Os vírus desse gênero infectam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo humanos, animais, plantas e insetos (ROY, 2017). Dentre as espécies de *Orbivírus* importantes na Medicina Veterinária um dos que se destacam é o vírus da língua azul (bluetongue virus, BTV), até então foram identificados 28 sorotipos distintos deste vírus (SUN et al., 2016), considerando como 28º o BTV XJ1407 isolado na China. Além disso, dois possíveis novos sorotipos de BTV foram descritos: um detectado em uma vacina de varíola ovina (SP) em Israel (BUMBAROV et al., 2016) e uma cepa adicional isolada de uma alpaca na África do Sul (WRIGHT, 2014). No entanto, muito pouca informação está disponível a partir dessas duas novas variedades BTV, Apenas as sequências parciais do genoma foram depositadas para a vacina SP BTV (BUMBAROV et al., 2016).

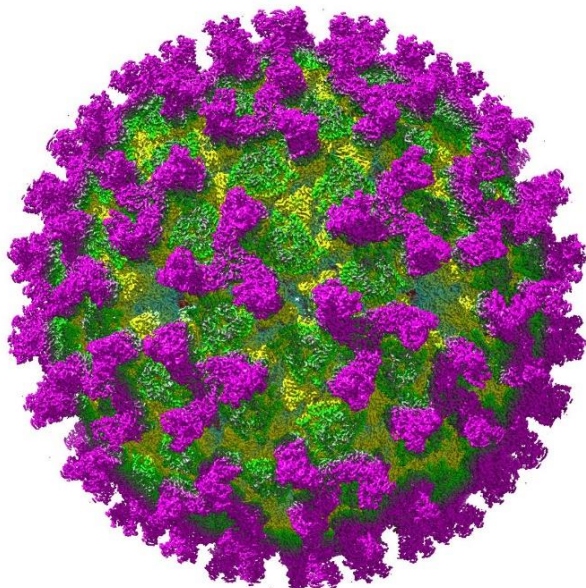
Os vírions maduros dos Reovírus típicos medem entre 60 e 85 nm de diâmetro, não apresentam envelope lipídico, e as proteínas que formam a partícula viral estão dispostas em camadas concêntricas que, geralmente, conferem uma simetria icosaédrica (FLORES, 2007) (FIGURA. 1).



Fonte: Adaptado de Joklik et al. Zinsser Microbiology 20th Ed.

Figura. 1 - Estrutura de um Reovírus típico.

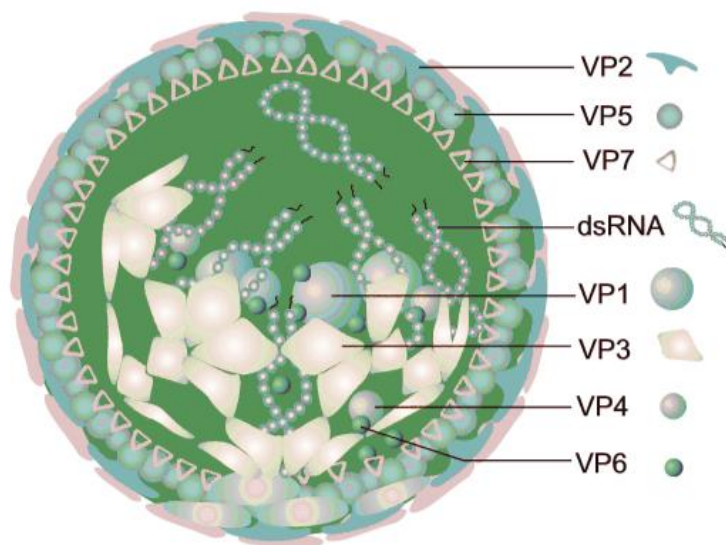
A análise da imagem do BTV por microscopia Cryo-Eletrônica (Cryo-EM) revelaram um arranjo estrutural bem ordenado do vírion, o invólucro exterior possui 60 espigões VP2 semelhantes a triskelion, envolvendo 120 trimers globulares de VP5 (ROY, 2017), a proteína de penetração da membrana (ZHANG et al., 2010) (FIGURA. 2).



Fonte: Adaptado de (<http://newsroom.ucla.edu/releases/cryo-electron-microscope-research-reveals-structure-and-mechanism-of-bluetongue-virus>).

Figura. 2 – Microscopia Cryo-Eletrônica (Cryo-EM) do BTV.

O genoma desses vírus é composto por 10 segmentos de dsRNA, divididos em três segmentos grandes (L1 a L3), três médios (M4 a M6) e quatro pequenos (S7 a S10), cada um deles codificando uma, duas ou três proteínas. O conjunto de segmentos genômicos codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e três proteínas não-estruturais (NS1 a NS3), destas a VP3 e a VP7 são as mais abundantes, como mostra a figura 3 (FLORES, 2007).



Fonte: Adaptado de Roy (2001).

Figura. 3 - Ilustração esquemática da estrutura de uma partícula vírica indicando os elementos constituintes.

1.2 Transmissão

O vetor é a chave para a transmissão de BTV entre animais. Os vetores são infectados com BTV após ingerir sangue de animais infectados, dentre estes destacam-se os mosquitos e carrapatos (FLORES, 2007).

O principal gênero de mosquitos conhecido como vetor é o *Culicoides*. Existem mais de 1000 espécies de *Culicoides*, mas menos do que 20 são considerados vetores competentes da BTV (GANTER, 2014), destes, destacam-se o maruim, o borrachudo e o mosquito pólvora. Outros insetos como *Aedes lineatopennis*, *Ornithodoros coriaceus* e *Melophagus ovinus*, podem transmitir o vírus (RIET-CORREA et al., 1996).

A atividade principal desses pequenos insetos é geralmente no entardecer e no amanhecer, devido à significativa multiplicação do vírus nas glândulas salivares dos insetos, um único ponto de inoculação é suficiente para a infecção de um ruminante com BTV (GANTER, 2014). A temperatura ideal para a replicação do vírus no inseto é $> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abaixo de $10\text{-}12\text{ }^{\circ}\text{C}$ não há replicação do vírus nos insetos. Um inseto infectado permanece infectado por toda a vida. Não existe transmissão transovariana do vírus entre as gerações seguintes dos insetos (GANTER, 2014). Além do *Culicoides* spp., a BTV pode ser transmitida de forma passiva por todos os insetos mordedores e sugadores, bem como de forma iatrogênica por

agulhas, instrumentais cirúrgicos, etc. Há também a possibilidade da transmissão intra-uterina em ruminantes (GANTER, 2014).

1.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Após a inoculação do vírus pelo vetor, uma replicação primária é iniciada nos linfonodos regionais, em cerca de 3 dias já se tem uma viremia (GANTER, 2014), e posterior migração para baço, timo e outros linfonodos. A BTV replica dentro de células fagocíticas e endoteliais mononucleares, linfócitos e possivelmente em outros tipos de células em tecidos linfoides, pulmões, pele e outros tecidos (GANTER, 2014), essa é uma característica marcante desse vírus. Além disso, o BTV se liga a glicoforinas na superfície dos eritrócitos, onde persiste em invaginações da membrana. Nesses locais, os vírions permanecem protegidos dos anticorpos circulantes por longo período, resultando em viremia prolongada, essa viremia de longa duração proporciona uma contínua oportunidade para a transmissão do agente (FLORES, 2007). A viremia pode persistir cerca de 40 dias em ovelhas até 80 dias no gado (GANTER, 2014). Devido à associação de BTV às células vermelhas do sangue, as sequências do genoma BTV são detectáveis até 100 dias após a infecção em ovelhas e até 220 dias em bovinos por PCR em tempo real (HOFFMANN et al., 2009).

A doença da língua azul resulta de lesões vasculares, provavelmente através de um processo análogo ao de febres virais hemorrágicas humanas, na qual a produção de mediadores vasoativos de macrófagos infectados por vírus e células dendríticas resulta em permeabilidade paracelular endotelial melhorada com subsequente vazamento vascular e choque hipovolêmico (MACLACHLAN, 2011).

As lesões são características e incluem na sintomatologia: hemorragia e úlceras na cavidade oral e trato gastrointestinal superior; necrose do músculo esquelético e cardíaco; coronite; hemorragia sub íntima na artéria pulmonar; edema dos pulmões e subcutâneo na porção ventral do pescoço e da parede abdominal; e derrames pericárdicos, pleurais e abdominais (MACLACHLAN et al., 2009). Outros sinais clínicos que podem ser observados são febre, corrimento nasal mucopurulento ou sanguinolento, lacrimejamento, salivação, cianose da mucosa oral e nasal, e edema da língua, focinho, lábios e mucosa oral (RIET-CORREA et al., 1996).

Alguns animais ainda apresentam severas claudicações com lesões de laminite. Em bovinos a esfoliação do epitélio dos tetos também pode estar presente e se a infecção ocorrer

em vacas prenhes ainda podem ocorrer abortos ou malformações congênitas (RIET-CORREA et al., 2007). Aparentemente as infecções em caprinos não promovem sinais clínicos evidentes (ELBERS et al., 2008).

1.4 Diagnóstico

Historicamente, a confirmação laboratorial do sorotipo de BTV dependia do isolamento e amplificação do vírus por inoculação de glóbulos vermelhos de ovelha lavados e lisados (RBC) ou tecido homogeneizado em ovos de galinha embrionados e / ou culturas de células (BHK21, Vero e células de insetos) (BREARD et al., 2004) e subsequente sorotipagem do vírus usando o teste de neutralização do vírus (VNT) (“Access online”, [s.d.]).

Em regiões com transmissão conhecida, a doença pode ser diagnosticada com base nas lesões características em animais suscetíveis. No entanto, o diagnóstico deve ser sempre confirmado pelo isolamento do vírus e identificação usando um método capaz de detectar BTV no sangue (TABACHNICK; SMARTT; CONNELLY, 2008).

Os 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.

1.5 A caprinocultura no Brasil e na Paraíba

A produção de pequenos ruminantes a muito tempo é uma atividade altamente explorada no Brasil, com destaque para a criação de caprinos. Em 2015, o país possuía um rebanho caprino de 9.614,722 milhões de cabeças, registrando crescimento de 8,6% em relação ao número de cabeças de 2014, distribuídos por todas as regiões do país, sendo que 92,6% da produção de caprinos está concentrada na Região Nordeste (IBGE, 2014, 2015). Este grande rebanho está dividido em praticamente todos os estados, demonstrando quão forte e disseminada é a atividade no país. Entre os estados da região Nordeste, a Paraíba detém o 5º maior rebanho caprino do Brasil, estando sua maior concentração deste na região semiárida do estado.

A caprinocultura se apresenta como uma forte atividade pecuária na Paraíba, levando renda a milhares de famílias há muitos anos, tornando a criação de caprinos cultural na região (COSTA et al., 2008). Em estudo realizado por Costa et al. (2008) no semiárido nordestino, identificou-se que os caprinos criados são na sua maioria mestiços, criados em sistemas extensivos ou semi-intensivos e com uma leve predominância de animais com finalidade para produção de carne.

Nos últimos anos, com os incentivos governamentais a caprinocultura, várias associações de criadores têm surgido em busca de juntos melhorarem os seus rebanhos, as formas de comercialização, obterem mais espaço nos mercados e preços cada vez mais gratificantes (RIET-CORREA et al., 2013). Com isso inúmeros produtos têm sido obtidos a partir destes animais, tais como o leite e seus derivados (queijos, iogurtes, etc.), a carne, o couro e seus derivados (bolsas, cintos, botas, etc.).

1.6 O Vírus da Língua Azul no Brasil e no Mundo

Apesar dos primeiros relatos do VLA só terem sido publicados no final do século XIX e início do século XX, a LA foi inicialmente descrita por fazendeiros na África do Sul como “febre catarral ovina” e causou sérios transtornos, sendo observada após a importação de ovinos da raça Merino da Europa, no final do século XVIII (PINHEIRO et al., 2013).

Como o vírus pode se espalhar rapidamente causando sérias consequências econômicas nos países afetados, a doença foi classificada como uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (PASCUAL-LINAZA et al., 2014).

Segundo Costa et al. (2006), o primeiro relato da presença do VLA no Brasil foi em 1978, com a demonstração de anticorpos anti-VLA em bovinos e em ovinos de propriedades do Estado de São Paulo. Desde então vários estudos sorológicos têm relatado a positividade de animais para os anticorpos anti-VLA em todo o Brasil.

Ao que se refere aos rebanhos caprinos, Silva et al. (1988) encontraram uma prevalência de 6,8% no estado de Minas Gerais. Mais tarde Lobato et al. (2001) citado por Scolari et al. (2011) observaram uma prevalência de 42%. Estudos de Silva (2002) constataram uma prevalência de 31% no estado do Ceará. No estado de Pernambuco, Motta (2011) observou uma prevalência de 24% do VLA em rebanhos caprinos. Silva et al. (2012) encontraram uma soroprevalência de 1,1% em rebanhos leiteiros de caprinos no estado da Paraíba.

1.7 A problemática

Mesmo apresentando uma grande população de caprinos, representada com uma das principais atividades de exploração animal e com significativa representatividade na produção pecuária nacional, estudos epidemiológicos realizados para a investigação da prevalência de patógenos virais que venham causar prejuízos econômicos ainda são bastante escassos ou não possuem abrangência populacional significativa, seja por limitação geográfica ou de amostragem.

A LA tem se mostrado como uma doença de grande impacto socioeconômico, tanto por perdas diretas referentes a queda de produção, descarte de animais, despesas médicas veterinárias, mas também por meio de restrições ao comércio internacional de animais e de seus produtos (COSTA et al., 2006).

De todos os Orbivírus, o BTV é o que demonstra maior impacto na economia global (ATTOUI et al., 2009). As perdas associadas à BTV para 2007 foram estimadas em US\$ 130 milhões nos Estados Unidos. O surto de BTV8 na França resultou em perdas estimadas em US\$ 1,4 bilhão (TABACHNICK; SMARTT; CONNELLY, 2008).

O Brasil se apresenta como grande potencial no mercado internacional, tanto na produção e exportação de carne e leite e derivados como de sêmen e embriões. Porém a movimentação do rebanho até mesmo entre países vizinhos, os que compõem o Mercosul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) exige uma análise obrigatória da presença do VLA ou de anticorpos (sorologia) nos animais ou em seus produtos (MERCOSUL/GMC/RES, 2005). Sendo assim, conhecer a prevalência do VLA em cada estado é essencial para que se consiga traçar metas e tomar medidas de controle e prevenção desta enfermidade.

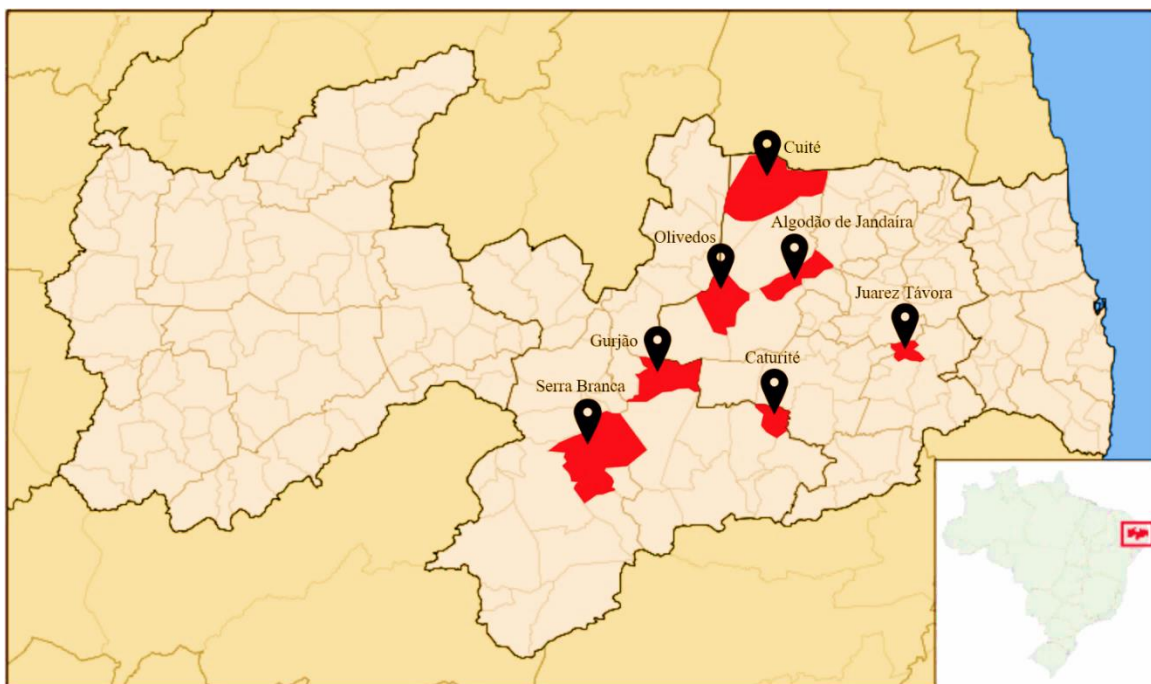
2. OBJETIVOS

Diante desta problemática, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise epidemiológica e identificar a soroprevalência do agente etiológico da Língua Azul em microrregiões produtoras de caprinos do estado da Paraíba, bem como sua correlação com alguns dados epidemiológicos obtidos das propriedades estudadas, e fatores climáticos e geográficos da região.

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1 A Área de Estudo

O trabalho, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, sob número de protocolo 3305/14, foi realizado em oito propriedades do estado da Paraíba distribuídas de A à H e seus respectivos municípios, A - Oivedos, B - Gurjão, C - Caturité, D – Juarez Távora, E – Cuité, F – Algodão de Jandaira, G - Caturité e H – Serra Branca. As propriedades foram escolhidas aleatoriamente tendo apenas como requisito a criação de caprinos, as mesmas estão distribuídas entre duas microrregiões da paraíba, o Cariri / Curimataú e o Agreste (FIGURA. 4).



Fonte: Adaptado de (<https://asnovidades.com.br/mapa-da-paraiba-para-colorir/>).

Figura. 4 – Distribuição geográficas dos municípios onde foram coletadas as amostras.

Essa divisão geográfica se refere a homogeneidade dos índices pluviométricos que para o Cariri / Curimataú a precipitação média anual é de 532,6 mm, com chuvas concentradas de fevereiro à julho e uma temperatura média anual de 24,5 °C, enquanto que o agreste se caracteriza por uma precipitação média anual é de 844,5mm, com chuvas concentradas de fevereiro à agosto e uma temperatura média anual de 25,5°C (FRANCISCO et al., 2015).

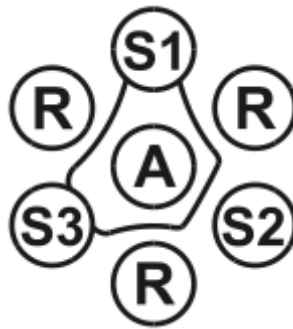
3.2 Amostragem e Processamento

Para o cálculo de amostragem foi adotada uma prevalência de 50%, aplicada em uma população tendendo ao infinito, com um nível de confiança de 95%, visto que a prevalência do vírus em caprinos da região é desconhecida na região, obtendo-se assim um número mínimo de amostras (n=385).

Foram coletadas 385 amostras de soro fracionadas a partir de aproximadamente 10 ml de sangue total colhidos de caprinos provenientes em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético sódico (EDTA-sódico) a 10%, na proporção de 1,8 mg/mL de sangue, os mesmos foram encaminhados ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (HV/CCA/UFPB) sob refrigeração (4°C), fracionados em soro e armazenados a temperatura de -20°C até o momento de seu processamento, porém, posteriormente 41 amostras foram perdidas e 344 foram processadas.

A pesquisa baseada primariamente na detecção de anticorpos contra proteínas estruturais dos vírus foi realizada pelo teste de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA) fornecido pelo Veterinary Medical Research and Development - VMRD, Pullman, EUA, os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações e instruções do fabricante. Este kit de teste de anticorpos contra BTV é um ensaio de imunodifusão de agar-gel (IDGA) que ocorre em agarose usando o procedimento padrão de 7 potes descritos por (Pearson, 1979).

O procedimento se deu colocando 20 µl de antígenos de vírus da língua azul (A) no poço central e 20 µl de soro de referência positiva (R) em poços periféricos alternados, deixando três poços vazios para amostras (Figura 1). Em seguida foi colocado 20 µl de cada amostra em poços alternados vazios. Este arranjo fornece uma linha de controle positivo em cada lado do soro de teste, facilitando assim a determinação precisa de linhas de identidade. Preenchendo o nível dos poços com a superfície do ágar, não deixando nenhum menisco. O soro ou o antígeno não devem correr em cima do ágar. Deixa-se as placas se ajustar alguns minutos antes de se mover para reduzir a possibilidade de derramamento. Por último colocou-se as placas em uma câmara úmida fechada e incubada a 23 ± 2 ° C.



Fonte: Adaptado de Bluetongue Virus Antibody Test Kit - Assay Instructions for Catalog Number: 288-100

Figura. 5 – Ilustração do ensaio de Imunodifusão de ágar-gel (IDGA).

3.3 Fatores Analisados

O objeto de estudo do presente trabalho, utilizado para as análises foram os anticorpos séricos anti-BTV, além dos fatores: idade, sexo, finalidade de criação, tamanho de rebanho e sistema de criação, estes, foram coletados por meio de um questionário simples aplicado no momento das visitas as propriedades.

3.4 Análises Estatísticas

As análises de associação entre os riscos foram calculadas pelo teste de qui-quadrado ou exato de Fisher com significância estatística $p < 0,05$; os riscos considerados significantes foram utilizados para a análise univariada e multivariada para fatores de risco associados. As análises foram realizadas utilizando o programa EpiInfo™ 7 (versão 7.1.5).

4. RESULTADOS E DISCUSÕES

Das propriedades estudadas 37,5% (3/8) apresentaram positividade para o VLA sendo, das amostras processadas 2,03% (7/344) apresentaram-se positivas para anticorpos séricos anti-BTV. O maior número de amostras positivas foi encontrado na propriedade localizada no município de Olivedos com 8,33% de prevalência (4/48), seguida por Juarez Távora com 3,70% (2/54) e Cuité com 2,17% (1/46) (TABELA. 1).

Tabela. 1 – Distribuição de prevalência de amostras positivas nas propriedades estudadas.

BTV – IDGA		
PROPRIEDADE	+/n	(%)
A	4/48	8.33
B	0/43	0.0
C	0/44	0.0
D	2/54	3.70
E	1/46	2.17
F	0/39	0.0
G	0/50	0.0
H	0/20	0.0

+, Número de animais positivos; n, número de amostras.

Não há semelhanças dos valores de prevalência encontradas com a literatura pesquisada, isso pode ser explicado devido ao (n) inferior de amostras processadas ao que se necessitava, sendo assim, os valores de prevalência do VLA nestes municípios podem ter sido subestimados. O fator “clima” pode ter influenciado os valores de soro prevalência, naturalmente a região apresenta baixa umidade, a intensificação dessa baixa umidade e as altas temperaturas decorrentes do longo período de estiagem que vem acometendo o semiárido brasileiro, podendo explicar os baixos valores de prevalência, assim como descrito por Lobão et al. (2014).

Na análise univariada para os fatores de risco as variáveis selecionadas foram idade ($p = 0.3932$), sexo ($p = 0.5096$), finalidade de criação ($p = 0.0026$), tamanho de rebanho (0.4273) e sistema de criação ($p = 0.2700$), sendo que a finalidade de criação, foi o fator epidemiológico de maior significância, porém quando essas variáveis foram utilizadas na análise múltipla esta não foi identificada como fator de risco ($odds\ ratio = 0.000$), porém o fator sexo foi identificado pela análise múltipla como fator de risco ($odds\ ratio = 0.6295$), (TABELA. 2).

Tabela. 2 – Fatores correlacionados ao aparecimento de anticorpos séricos anti-BTV.

PROPRIEDADE	VARIÁVEL	BTV – IDGA				
		+/n	(%)	O.R	IC 95%	P-valor
Idade	>1	5/279	1.79	0.5748	0.11- 3.03	0.3932
	≤1	2/65	3.08			
Sexo	Fêmea	6/311	1.93	0.6295	0.07-5.39	0.5096
	Macho	1/33	3.03			
Finalidade de Criação	Leite	0/195	0.0	0.0000	Indefinido	0.0026
	Carne	7/149	4.70			
Tamanho do Rebanho	>50	7/305	2.30	Indefinido	Indefinido	0.4273
	≤<50	0/39	0.0			
Sistema de produção	Semi-intensivo	7/285	2.46	Indefinido	Indefinido	0.2700
	Extensivo	0/58	0.0			

+, Número de animais positivos; n, número de amostras; (%), percentagem de amostras positivas; OR, odds ratio; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; P-valor, probabilidade de significância.

Ainda foi observado que 100% dos animais positivos pertenciam a propriedades que criavam os animais em sistema semi-intensivo, isso se deve provavelmente pela presença de anticorpos cruzados, assemelhando-se aos resultados encontrados por (SILVA; MODENA; MOREIRA, 1998). Os maiores valores de animais soropositivos para fêmeas de mais de um ano de idade e em propriedade com mais de 50 animais, provavelmente ocorre pelo maior número de animais amostrados destas classes.

Devido aos muitos sinais clínicos inespecíficos apresentados nos ovinos, várias doenças podem ser confundidas com LA, tais como ectima contagioso, febre aftosa, estomatite vesicular, peste de pequenos ruminantes, varíola ovina, a pneumonia, a fotossensibilização, a febre do Vale do Rift, gastroenterites parasitárias, pododermatite e até a dermatite ulcerativa (WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008). Muitas vezes o número de animais portadores de VLA podem ser subestimados devido à falta de realização de exames diagnósticos para o mesmo, fazendo-se necessário uma melhor investigação do agente causador caso estes sinais clínicos estejam presentes em um determinado rebanho.

Pelo fato dos caprinos raramente apresentarem sinais clínicos, porém, permanecerem portadores do vírus, estes podem ser considerados como fator de risco para rebanhos de ovinos, bem como para a manutenção do vírus, assim como os bovinos que não manifestam sinais clínicos

Como o VLA depende dos artrópodes vetores para sua manutenção na natureza as condições de temperatura e umidade que favorecem sua multiplicação e manutenção. Sendo assim, estes insetos caracterizam-se como importantes fatores epidemiológicos. O fator

“período de realização da pesquisa”, pode ter influenciado o número de animais soropositivos, tendo em vista a baixa pluviosidade dos últimos anos na região.

5. CONCLUSÕES

Mesmo com diversos fatores que contribuíram negativamente para a real identificação da prevalência, os resultados encontrados do estudo ainda apontam para um certo grau de prevalência do VLA no estado da Paraíba, porém os resultados ainda são insuficientes para se saber ao certo seus riscos e seus impactos reais. Sendo assim, faz-se necessário novos estudos soropidemiológicos mais detalhados e aprofundados acerca da soroprevalência do VLA bem como seus fatores de risco. Para tanto, deve utilizar novas técnicas de identificação que se façam mais eficientes tais como o RT-PCR e o sequenciamento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Access online: OIE - World Organisation for Animal Health. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>.

ATTOUI, H. et al. Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: Their relationships and taxonomy. **Elsevier**, p. 23–52, jul. 2009.

BREARD, E. et al. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 1–8, ago. 2004.

BUMBAROV, V. et al. Detection and isolation of Bluetongue virus from commercial vaccine batches. **Vaccine**, v. 34, n. 28, p. 3317–3323, jun. 2016.

COSTA, J. R. R. et al. Bluetongue virus antibodies in cattle and sheep in southwest and southeast regions of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 273–275, 2006.

COSTA, R. G. et al. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do Estado da Paraíba. Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 57, n. 218, 2008.

ELBERS, A. R. W. et al. Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 1–2, p. 156–162, maio 2008.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1. ed. Santa Maria: UFSM, 2007.

FRANCISCO, P. R. M. et al. Oscilações pluviométricas e temperatura média do ar em seis regiões homogêneas do estado da Paraíba. **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia CONTECC**, 2015.

GANTER, M. Bluetongue disease—Global overview and future risks. **Small Ruminant Research**, v. 118, n. 1–3, p. 79–85, maio 2014.

GIBBS, E. P. J.; GREINER, E. C. The epidemiology of bluetongue. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 17, p. 207–220, 1994.

HOFFMANN, B., et al. Blauzungenkrankheit in Deutschland – Klinik, Diagnostik und Epidemiologie. In: **Presentation at the Advanced Training Course for Sheep Specialists**. 2009.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>>. Acesso em: 11 jun. 2017.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default_xls_brasil.shtm>. Acesso em: 11 jun. 2017.

JENCKEL, M. et al. Complete Coding Genome Sequence of Putative Novel Bluetongue Vírus Serotype 27. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. e 00016-15, 30 abr. 2015.

LOBÃO, F. M. et al. Língua azul em ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 69–74, 2014.

LOBATO, Z. I. P. et al. Língua azul em ovinos e caprinos na Região Mineira da SUDENE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 1, 2001, Campo Grande. **Anais**. Campo Grande: Sociedade Brasileira de Buiatria, 2001. p. 165.

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

MACLACHLAN, N. J. Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 107–111, nov. 2011.

PASCUAL-LINAZA, A. V. et al. Evaluation of the spatial and temporal distribution of and risk factors for Bluetongue serotype 1 epidemics in sheep Extremadura (Spain), 2007–2011. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 116, n. 3, p. 279–295, out. 2014.

PEARSON, J.E. AND JOCHIM, M.M. **Annual Proceedings of the American Association of Laboratory Diagnosticians** pp 463-471, 22nd, 1979.

PINHEIRO, R. R. et al. Antibodies against the bluetongue virus in sheep flocks of Ceará state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 35–42, 2013.

RIET-CORREA, B. et al. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 33, n. 3, p. 345–352, 2013.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. São Paulo: Fernoti, 2007. v. 1

RIET-CORREA, F. et al. Víroses Confundíveis com Febre Aftosa: Revisão. **Ciência Rural**, v. 26, p. 323–332, 1996.

ROY, P. Orbivirus. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.56, p.1835-1869.

SCOLARI, A. P. R. et al. O vírus da língua azul em ruminantes domésticos: situação de alerta no Brasil–Revisão. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, p. 407–413, 2011.

SILVA, J. A. DA; MODENA, C. M.; MOREIRA, É. C. Frequência de febre aftosa, língua azul e leucose enzoótica bovina em cabras de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, p. 393–403, 1998.

SILVA, M. X. **Soroprevalência da língua azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades do Ceará**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em

Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

SILVA, M.L.C.R. et al. **Prevalência e fatores de risco para a língua azul em propriedades de caprinos leiteiros do semiárido do Estado da Paraíba.** 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinárias) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2012.

SUN, E. C. et al. Emergence of a Novel Bluetongue Virus Serotype, China 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 6, p. 585–589, dez. 2016.

TABACHNICK, W. J.; SMARTT, C. T.; CONNELLY, C. R. Bluetongue. **Univerity Of Florida**, 2008.

WILLIAMSON, S.; WOODGER, N.; DARPEL, K. Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. **In Practice**, p. 242–251, 2008.

WRIGHT, I. M. **Serological and genetic characterisation of putative new serotypes of bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus isolated from an Alpaca.** [s.l: s.n.].

ZHANG, X. et al. Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 14, p. 6292–6297, 6 abr. 2010.

ANEXO

ANEXO A – Questionário aplicado nas propriedades.

CIDADE: _____ **PROPRIEDADE:** _____

PROPRIETÁRIO: _____

NÚMERO TOTAL DE ANIMAIS DO REBANHO: _____ **AMOSTRAS:** _____

TAMANHO DO REBANHO:

() >50 ANIMAIS () =<50 ANIMAIS

FINALIDADE DE CRIAÇÃO:

() CAPRINOS DE LEITE () CAPRINOS DE CORTE () APTIDÃO
MISTA

RAÇA:

() MOXOTÓ () SAANEN () PARDA ALPINA () MISTIÇAS
() CANINDÉ () BOER

NÚMERO DE ANIMAIS			
IDADE		SEXO	
> 1 ano	< 1 ano	Fêmea	Macho