

PESQUISA AGROPECUÁRIA GAÚCHA

ISSN 0104 - 9070

Volume 4

Número 1

1998

CONTEÚDO

Página

SEÇÃO: VETERINÁRIA

- Nefrose Iatrogênica em leitões. BARCELLOS, D.E.S.N. de; BOROWSKI, S.M.; RODRIGUES, N.C.; FALLAVENA, L.C.B.; MADRUGA, G. 11
- Epidermite exsudativa em reprodutoras suínas. BARCELLOS, D.E.S.N. de; BOROWSKI, S.M.; STEPAN, A.L.; RODRIGUES, N.C. 15
- Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos com pleurite. STEPAN, A.L., BARCELLOS, D.E.S.N. de ; BOROWSKI, S.M. 19
- Influência do uso de aspersões com desinfetante sobre a ocorrência de tosse e espirros em suínos de terminação. BARCELLOS, D.E.S.N. de, BOROWSKI, S.M., WALD, V. 23
- Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos no município de Livramento, RS: prevalência e implicações epidemiológicas. MARTINS, J.R.; HANCOCK, R.; LIMA CORRÊA, B.; CERESÉR, V.H. 27
- Hiperostose congênita em leitões no Rio Grande do Sul. FALLAVENA, L.C.B.; BARCELLOS, D.E.S.N. de; RODRIGUES, N.C.; BOROWSKI, S.M. 31
- Papilomatose cutânea em suínos no Rio Grande do Sul. FALLAVENA, L.C.B.; RODRIGUES, N.C.; BARCELLOS, D.E.S.N. de 33
- Anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina em animais da raça leiteira importados do Uruguai. BRAGA, A. de C.; ROSA, J.C. de A.; OLIVEIRA, L.G.; RECKZIEGEL, P.E.; TEIXEIRA, J.C.F.; LISBOA, C.S. 35
- Persistência de reações sorológicas em búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com *Brucella abortus* amostra 19. POESTER, F.P.; RECKZIEGEL, P.E. 39
- Influência do polimorfismo da hemoglobina na resistência natural à verminose em ovinos da raça Corriedale. CHIMINAZZO, C.; RIBEIRO, L.A.O.; WEIMER, T. de A. 43
- Correlação entre os tipos de hemoglobina e a performance produtiva em ovinos Corriedale. CHIMINAZZO, C.; RIBEIRO, L.A.O.; WEIMER, T. de A. 49
- A erradicação da Febre Aftosa no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. PRADO, J.A.P.; PETZHOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; TEIXEIRA, J.C.F. 55
- Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra Herpesvírus Bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C. da ; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. 61
- Anticorpos monoclonais contra o Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5). ALMEIDA, R.S. de; MELO, S.V. de; SILVA, T.C. da ; OLIVEIRA, L.G.; LEMOS, R.A.A.; ROEHE, P.M. 67
- Avaliação da relação antigênica e imunogênica entre amostras de campo e amostras vacinais do vírus da doença infecciosa bursal, através do "Western Blotting". MORAES, H.L. de S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. do 73

PESQUISA AGROPECUÁRIA GAÚCHA

ISSN 0104 - 9070

Volume 4

1998

Number 1

CONTENTS

Page

SECTION: VETERINARY

- Iatrogenic Nephrosis in piglets. BARCELLOS, D.E.S.N. de; BOROWSKI, S.M.; RODRIGUES, N.C.; FALLAVENA, L.C.B.; MADRUGA, G.	11
- Clinical characteristics of exsudative epidermitis in sows. BARCELLOS, D.E. S.N. de; BOROWSKI, S.M.; STEPAN, A.L.; RODRIGUES, N.C.	15
- Antimicrobial sensitivity of <i>Pasteurella multocida</i> strains isolated from pleuritis in pigs. STEPAN, A.L., BARCELLOS, D.E.S.N. de; BOROWSKI, S.M.	19
- Influence of spraying with disinfectants on some clinical indexes in pig production. BARCELLOS, D.E.S.N. de, BOROWSKI, S.M., WALD, V.	23
- Occurrence of antibodies to <i>Toxoplasma gondii</i> in flocks of sheep in the district of Livramento, RS: prevalence and epidemiological implication. MARTINS, J.R.; HANCOCK, R.; LIMA CORRÊA, B.; CERESÉR, V.H.	27
- Congenital hyperostosis in piglets in the State of Rio Grande do Sul. FALLAVENA, L.C.B.; BARCELLOS, D.E.S.N. de; RODRIGUES, N.C.; BOROWSKI, S.M.	31
- Cutaneous papillomatosis in pigs. FALLAVENA, L.C.B.; RODRIGUES, N.C.; BARCELLOS, D.E.S.N. de	33
- Presence of antibodies against bovine leukemia virus in dairy cattle imported from Uruguay. BRAGA, A. de C.; ROSA, J.C. de A.; OLIVEIRA, L.G.; RECKZIEGEL, P.E.; TEIXEIRA, J.C.F.; LISBOA, C.S.	35
- Persistent serological reactions in buffalo heifers (<i>Bubalus bubalis</i>) vaccinated with <i>Brucella abortus</i> strain 19. POESTER, F.P.; RECKZIEGEL, P.E.	39
- Relationships between hemoglobin types and natural resistance to nematode parasites in Corriedale sheep. CHIMINAZZO, C.; RIBEIRO, L.A.O.; WEIMER, T. de A.	43
- The relationship between hemoglobin types and productive performance in Corriedale sheep. CHIMINAZZO, C.; RIBEIRO, L.A.O.; WEIMER, T. de A.	49
- Foot-and-Mouth disease eradication in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. PRADO, J.A.P.; PETZHOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; TEIXEIRA, J.C.F.	55
- Differences in neutralizing antibody levels to Bovine Herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C. da ; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M.	61
- Monoclonal antibodies to Bovine Herpesvirus type 5 (BHV-5). ALMEIDA, R.S. de; MELO, S.V. de; SILVA, T.C. de; OLIVEIRA, L.G.; LEMOS, R.A.A.; ROEHE, P.M.	67
- Antigenic and immunogenic relationship between field and vaccinal samples of the infectious bursal disease: a comparative study. MORAES, H.L. de S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. do	73

SEÇÃO: VETERINÁRIA

NEFROSE IATROGÊNICA EM LEITÕES

DAVID E.S.N. de BARCELLOS¹, SANDRA M. BOROWSKI², NORMA C. RODRIGUES³, LUIZ C.B. FALLAVENA³, GERSON MADRUGA⁴

RESUMO – O presente relato apresenta as principais características clínicas e patológicas de um surto de doença cursando com alta mortalidade, afetando leitões submetidos ao regime de desmame precoce, ocorrido no período imediatamente posterior ao desmame. Os sintomas presentes foram de diarreia, com sintomatologia nervosa antecedendo a morte. Na necropsia, as lesões mais marcantes foram no intestino (enterite) e rins (se apresentavam pálidos e aumentados de volume). O resultado dos exames histopatológicos e o histórico do uso de injeções de um produto aminoglicosídeo (sulfato de gentamicina) numa dosagem aproximadamente três vezes superior à recomendada, permitiu o diagnóstico de nefrose iatrogênica. A idade precoce dos animais afetados e a desidratação provocada pela diarreia seriam fatores predisponentes ao problema.

Palavras-chave: Suíno, intoxicação, nefrose, gentamicina.

IATROGENIC NEPHROSIS IN PIGLETS

ABSTRACT – In the present report, we describe the main clinical and pathological characteristics of a disease with high mortality, affecting early-weaned piglets. The symptoms were diarrhoea and nervous symptoms preceding death. At post mortem examination, the main lesions were observed in the intestinal tract (enteritis) and kidneys (pale and swollen). The results of histopathological examination and the use of injections of an aminoglycoside product (gentamicin) in a dosage about three times above recommended levels suggested a diagnosis of iatrogenic nephrosis. The early age of affected animals and the severe dehydration caused by diarrhoea could be interpreted as predisposing factors.

Key words: Pigs, Intoxication, Nephrosis, Gentamicin.

INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos aminoglicosídeos na terapêutica em suinocultura deve ser efetuado com cautela. Se de um lado as drogas desse grupo apresentam potente ação terapêutica e atividade bactericida de amplo espectro, de outro possuem um potencial tóxico muito significativo. Esse manifesta-se por três síndromes primárias: nefrotóxicose, danos ao 8º par de nervos cranianos e bloqueio neuromuscular (THOMSON, 1990). Entre esses efeitos, o dano ao parênquima renal é o mais comum e severo

e a gentamicina é a que apresenta maior nefrotóxicidade entre as drogas do grupo (CONZELMAN, 1980).

A gentamicina danifica os túbulos proximais, reversível ou irreversivelmente, dependendo de fatores como dose e duração da exposição. A idade do animal também exerce influência, pois em algumas espécies (cães e eqüinos), a sensibilidade é maior nos jovens. Outros fatores capazes de aumentar a suscetibilidade à intoxicação incluem a desidratação (como se verifica nos casos de diarreia) e a insuficiência cardíaca congestiva (BENITZ, 1984).

1. Méd. Vet., M.Sc. – Professor da Faculdade de Veterinária da UFRGS e FFFCMPA, Av. Bento Gonçalves 9090, 95140-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.
2. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisas Veterinária Desidério Finamor, e FFFCMPA, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL.
3. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisas Veterinária Desidério Finamor, e ULBRA, Porto Alegre – RS/BRASIL.
4. Méd. Vet. – Pelotas – RS/BRASIL.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

Em ratos, efeitos clínicos evidentes podem ser observados por exposição a doses moderadas da droga (20,0 mg/kg) por sete a dez dias (RIVIERE e COPPOC, 1981). O quadro de intoxicação inicia-se com o acúmulo da droga no parênquima renal, isso sendo facilitado pelo fato de que 90% da mesma é eliminada por filtração renal. A partir daí, ocorre dano aos túbulos contorcidos proximais e, secundariamente, lesão intersticial. Os locais de ligação do antibiótico são os fosfolípidos da membrana celular do epitélio dos túbulos contorcidos proximais. O mecanismo exato da lesão é pouco claro, aparentemente envolvendo alterações na estabilidade das membranas dos lisossomos e inibição intracelular de fosfolípidos (THOMSON, 1990).

Em uma revisão da bibliografia disponível sobre a farmacoterapêutica da gentamicina, não foram encontradas referências relativas à suscetibilidade ou doses tóxicas para suínos.

O presente relato apresenta as características de caso clínico de nefrose consecutiva à injeção de doses anormalmente elevadas de um produto aminoglicosídeo (gentamicina), usada para tratar leitões com diarreia em granja no Estado do Rio Grande do Sul.

DESCRIÇÃO DO CASO

O problema ocorreu numa creche de sistema de criação de desmame precoce. Os animais foram recebidos nesse local após o desmame, sendo esse último realizado entre oito a dez dias de idade. As creches eram de piso compacto, com presença de estrutura semifechada (escamoteador) na área frontal.

A mortalidade dos leitões havia aumentado na época fria do ano (julho). Os sintomas mais relevantes foram de diarreia e, pelo exame de materiais remetidos ao laboratório nessa ocasião, foi obtido um diagnóstico de colibacilose. A amostra isolada foi sensível à combinação sulfa/trimetoprim. A medicação dos leitões no início da apresentação dos sintomas com esse antibacteriano mostrou-se eficiente por um período curto de tempo. A partir daí, progressivamente, notou-se um recrudescimento da mortalidade. Suspeitou-se da influência do frio em predispor às infecções intestinais que estavam ocorrendo na granja, sendo providenciado reforço de aquecimento e colocação de camada espessa de maravalha na área frontal das baias. Apesar dessas medidas, o problema continuou se agravando. Passou-se então à medicação com injeções de sulfato de gentamicina (aproximadamente 20,0 mg/kg, por via subcutânea, por três dias); a situação continuou piorando. Na semana da coleta dos materiais para os exames laboratoriais, o quadro havia atingido particular gravidade. Dos 52 leitões pertencentes ao último lote chegado às creches, 51 morreram. Os sinais clínicos iniciavam entre o 2º ou 3º dias após a transferência dos lei-

tões e consistiam de diarreia aquosa, em alguns casos com características hemorrágicas. Nos dias subsequentes ao início da diarreia, os leitões mostravam-se apáticos, recusando-se ou apresentando dificuldades em se alimentar, sendo frequente o aparecimento de vômito. Na fase terminal, alguns leitões apresentavam sintomas de incoordenação motora e, com menor frequência, outros sinais nervosos. Não foi possível relacionar a alimentação (leite em pó diluído) com as diarreias. Numa consulta ao fabricante do leite em pó em uso, não constava que o produto estivesse causando problemas, pois foi vendido também para o consumo humano.

Foram remetidos ao laboratório cinco leitões para a realização de necropsia e coleta de materiais para exames bacteriológico e histopatológico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lesões mais consistentes observadas à necropsia foram de desidratação, gastrite, enterite catarral e presença de conteúdo líquido nos intestinos delgado e grosso. Em alguns casos constatou-se áreas hemorrágicas no jejuno. Os rins estavam discretamente aumentados de volume e exibiam a superfície pálida.

O exame bacteriológico do conteúdo intestinal mostrou, em todos os casos, crescimento significativo de *Escherichia (E.) coli* enterotoxigênica. O antibiograma revelou resistência à gentamicina, danofloxacina, ácido oxolínico, apramicina e cloranfenicol, e sensibilidade à colistina.

O exame histopatológico mostrou nos rins, hemorragias focais, áreas de fibroplasia intersticial, presença de cilindros hialinos, dilatação dos túbulos contorcidos distais e alterações nos túbulos contorcidos proximais, que variavam de lesões degenerativas a necróticas. O epitélio dos túbulos contorcidos proximais mostrava aspecto granular e intensa eosinofilia. Foram observadas também lesões de enterite, gastrite e congestão cerebral.

O quadro descrito parece indicar que o problema central tenha sido uma infecção por *E. coli*, responsável pelos sinais de diarreia que ocorriam a partir do 2º dia após a chegada na granja. O frio prevalente nessa época do ano, aliado ao estresse do transporte e à perda de anticorpos que foram veiculados passivamente pelo leite da porca seriam fatores predisponentes. A amostra bacteriana isolada seria extremamente virulenta, além das alterações secretórias comuns à colibacilose nessa idade, seria provável que estivesse ocorrendo um ataque às vilosidades intestinais (mecanismo enteropatogênico). Isso explicaria a grande congestão e hemorragia presentes em alguns casos. Alternativamente, as lesões de gastrite e hemorragia intestinal poderiam ser explicadas pela uremia, conseqüente à disfunção renal grave (como a presente no caso atual). A amostra

era resistente à gentamicina, daí a falta de resposta ao tratamento. A dose de gentamicina usada (20,0 mg/kg) era aproximadamente três vezes superior à recomendada para a terapêutica usual de leitões (que se situa entre 5,0 a 8,0 mg/kg) (3). A desidratação dos mesmos poderia estar contribuindo ao quadro de intoxicação.

Pela inexistência de dados sobre os níveis capazes de intoxicar suínos, a hipótese de intoxicação não pode ser totalmente comprovada, embora as lesões histopatológicas tenham sido semelhantes às descritas na literatura em casos de intoxicação por gentamicina em outras espécies (RIVIERE e COPPOC, 1981; THOMSON, 1990). Cabe também ressaltar as condições especiais em que ocorreu o problema, em leitões desmamados em idade muito precoce, injeção da droga em doses aproximadamente 3 vezes superiores à preconizada e ocorrência simultânea de desidratação. Estudos de intoxicação experimental em leitões poderiam contribuir para uma melhor compreensão desse tipo de patologia.

CONCLUSÕES

No diagnóstico diferencial das causas de mortalidade em leitões recém-desmamados deve ser considera-

da a possibilidade da intoxicação por aminoglicosídeos. Esse tipo de suspeita merece especial consideração, no caso de serem detectadas lesões renais macroscópicas e microscópicas, associadas a quadro de desidratação.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BENITZ, A.M. Future developments in the aminoglycoside group of antimicrobial drugs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.185, n.10, p.1118-1123, 1984.
- CONZELMAN, G.M. Pharmacotherapeutics of Aminoglycoside antibiotics. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 176, n.10, p. 1078-1080, 1980.
- RIVIERE, J.E.; COPPOC, G.L. Selected aspects of aminoglycoside antibiotic nephrotoxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.178, n.5, p. 508- 509, 1981.
- THOMSON, R. *Patologia Veterinária Especial*. São Paulo: Manole, 1990. 753 p.

EPIDERMITE EXSUDATIVA EM REPRODUTORAS SUÍNAS

DAVID E. S. N. de BARCELLOS¹, SANDRA M. BOROWSKY², ANA LÚCIA STEPAN³, NORMA C. RODRIGUES⁴

RESUMO – No presente relato, são descritas as características clínicas e patológicas de caso de epidermite exsudativa em porcas adultas. A apresentação da doença em animais dessa idade é muito rara, existindo poucos relatos de condições semelhantes na literatura. As características lesionais encontradas diferiram significativamente de alguns registros anteriores.

Palavras-chave: Suíno, doença, pele, epidermite exsudativa, *Staphylococcus hyicus*.

CLINICAL CHARACTERISTICS OF EXSUDATIVE EPIDERMITIS IN SOWS

ABSTRACT – In the present report, we describe the clinical and pathological characteristics of exsudative epidermitis in sows. Reports of this disease in adult pigs are rare; there are very few publications of similar cases. The lesions observed in the affected animals were substantially different from previous reports.

Key words: Skin diseases of pigs, exsudative epidermitis, *Staphylococcus hyicus*.

INTRODUÇÃO

Uma forma de dermatite seborréica generalizada de leitões de maternidade é conhecida como Epidermite Exsudativa ou Eczema Úmido. Ocorre com maior frequência em animais com 2 a 4 semanas de idade, numa forma clínica que se caracteriza por lesões cutâneas generalizadas e com menor frequência, por lesões renais. No Brasil, a primeira descrição foi de WENTZ e MEINCKE (1975). Posteriormente, BARCELLOS et al. (1975) isolaram o agente (*Staphylococcus hyicus*) e reproduziram pela primeira vez a doença no nosso meio. O agente é um coco Gram positivo que faz parte da flora normal da pele dos suínos, e são considerados como fatores importantes ao desencadeamento do quadro clínico a presença de ambiente contaminado com a bactéria e uma solução de continuidade na pele do leitão (PENNY, 1981).

Além dessa forma generalizada em leitões lactentes, um outro tipo de apresentação menos frequente é uma infecção que ocorre nas primeiras semanas que se seguem ao desmame. As lesões presentes são crostosas e circulares, localizadas predominantemente na cabeça e flancos. Um fator predisponente importante nessa forma de apresentação são os ferimentos consequentes às brigas entre os leitões, na fase de adaptação à creche. As características detalhadas de um surto desse tipo no nosso meio foram descritas por BARCELLOS et al. (1989).

Um terceiro tipo de apresentação da epidermite exsudativa é a infecção em animais adultos. Registros desse tipo de infecção são muito raros. TAYLOR (1993) afirma que nessa idade a doença varia em severidade, ocorrendo como lesões localizadas na parte externa dos membros posteriores ou no flanco. As lesões presentes são áreas de epidermite exsudativa amarronzadas, em alguns casos com presença de ulcerações. Numa outra descrição desse tipo de infecção (PENNY, 1981), as lesões presentes foram caracterizadas por crostas escuras iniciando na parte posterior do pescoço, disseminado para cima na direção da coluna vertebral e, em casos severos, cobrindo todo o corpo.

O presente relato apresenta as características de caso clínico de epidermite exsudativa afetando porcas adultas no Rio Grande do Sul.

DESCRIÇÃO DO CASO

O problema foi apresentado em granja de porte industrial de área criatória do Rio Grande do Sul, afetando três matrizes. Nas instalações, foi observado que o piso das celas parideiras era compacto de concreto e as condições higiênicas do mesmo não eram boas, com muita umidade e acúmulo de detritos em determinados locais. Os primeiros dois casos foram observados simultaneamente em duas fêmeas de 3ª e 4ª gestações, e o terceiro caso numa fêmea de 7ª gestação.

Clinicamente, o achado foi a presença de crostas, mais evidentes na área inguinal. Essas se espalhavam

1. Méd. Vet., M.Sc. – Prof. da Faculdade de Veterinária da UFRGS e FFFCMPA, Av. Bento Gonçalves 9090, 95140-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.
2. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor e FFFCMPA, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL.
3. Méd. Vet., M.Sc. – Bolsista FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL.
4. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL e Professora do Curso de Medicina Veterinária da ULBRA.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

bilateralmente, desde o nível do último par de tetos inguinais até o 4º par de tetos peitorais no caso mais grave; nos outros dois, até o 2º par de tetos. As lesões tendiam a ser confluentes, na forma de uma crosta única com grande extensão e a presença de algumas crostas secundárias pequenas em áreas periféricas, Figura 1. A base dos mamilos se encontrava recoberta por crostas, mas as pontas se apresentavam livres, Figura 2. O aspecto era seco e duro e a coloração marrom-escura. Não foi verificado prurido ou quaisquer outras manifestações de doença sistêmica. A lactação parecia ser normal, com os leitões mostrando bom estado. Não foram registrados casos da doença nos leitões, com exceção de uma leitegada, onde três leitões com 15 dias de idade, de um lote de dez, apresentavam lesões cutâneas típicas de epidermite exsudativa.



FIGURA 1 – Lesões confluentes, em forma de crostas

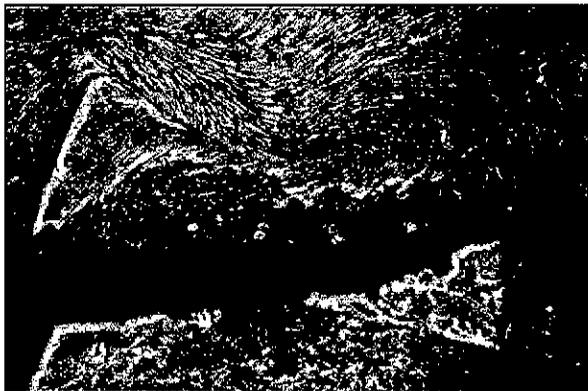


FIGURA 2 – Lesões crostosas na base dos mamilos

Foram coletados fragmentos de crostas para exame bacteriológico conforme técnicas de isolamento e classificação descritas por COWAN (1975). O antibiograma foi realizado com o uso da técnica de difusão em disco conforme STOKES e WATERWOTH (1972), com as seguintes discos e concentrações: penicilina, 10 UI;

furazolidona, 300mg; gentamicina, 10 mg; ácido oxolínico, 30 mg; tetraciclina, 30 mg; cloranfenicol, 30 mg.

Foi realizada biópsia na periferia das áreas afetadas, sendo o material fixado em formol a 10%, processado segundo técnicas rotineiras e corado pela Hematoxilina-Eosina (PENNY,1981) e examinado ao microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semeadura por impressão da parte inferior das crostas em placa de ágar-sangue (com sangue desfibrinado de ovino) demonstrou crescimento puro de colônias esbranquiçadas, não hemolíticas. Os testes bioquímicos das mesmas permitiu a classificação como *Staphylococcus hyicus*. Os antibiogramas de cinco cultivos bacterianos isolados de diferentes coletas mostraram que todas as cepas eram sensíveis à penicilina, gentamicina e furazolidona.

As lesões observadas no exame histopatológico foram de erosões, pústulas, espongiose, acantose e presença de células inflamatórias na derme.

As fêmeas afetadas foram tratadas com produto à base de penicilina na dose de 20.000 UI/kg durante 5 dias. A partir do 6º dia após o início do tratamento iniciou o desprendimento das lesões, com cura completa num período médio de 15 dias.

Com base nos achados clínicos, bacteriológicos e histopatológicos e a resposta à medicação usada, foi concluído o diagnóstico de epidermite exsudativa.

No diagnóstico diferencial dessa patologia, as lesões que mais se assemelham a esse quadro seriam aquelas causadas por queimadura com cal ou as dermatites cáusticas provocadas por desinfetantes. Não havia evidência desse tipo de associação no presente caso. O ambiente úmido e contaminado, bem como a presença simultânea de casos clínicos em leitões de uma leitegada, sugere a presença, na granja, de cepas toxigênicas do *Staphylococcus hyicus*, causador da doença. É possível que a porta de entrada para a infecção das fêmeas tenha sido ferimentos produzidos pelo leitão durante a estimulação para a mamada, pois esse tipo de ferimento tende a ser mais freqüente exatamente na área dos tetos posteriores, que em geral apresentam uma produção menos abundante de leite do que os tetos anteriores.

As lesões encontradas diferiram em localização daquelas diagnosticadas nos poucos registros encontrados na literatura (PENNY,1981; TAYLOR,1993).

CONCLUSÕES

No grupo de doenças a serem consideradas para o diagnóstico diferencial de lesões cutâneas crostosas localizadas na área inguinal em porcas adultas, deve ser

considerada a possibilidade de infecção por *Staphylococcus hyicus* (epidermite exsudativa).

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; FALLAVENA, L.C.B.; OLIVEIRA, L.C.B. Epidermite exsudativa suína: características clínicas e epidemiológicas de surto da doença em leitões desmamados. CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 4., 1989, Itapema. *Anais...*, Itapema: Comissão Científica do Congresso, 1989. p. 70.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; PIFFER, I.A.; SÁ e SILVA, A. Epidermite exsudativa dos suínos: isolamento do *Staphylococcus hyicus* e reprodução experimental da doença. *Boletim do IPVDF*, v. 3, p. 133-38, 1975.
- COWAN, S.T. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. 238p.
- PENNY, R.D. Greasy- Pig epidemics more common. *International Pig Letter*, St. Paul, v.1, n.8, p.1-2, 1981.
- STOKES, E.J.; WATERWOTH, P.M. *Association of clinical pathology*. London: Broadsheet 55, 1972. 4p.
- TAYLOR, D.J. Exudative Epidermitis. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.; MENGELING, W.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. *Diseases of swine*. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p. 522-525.
- WENTZ, I.; MEINCKE, W. Ocorrência de eczema úmido (epidermite exsudativa) em leitões, em Arroio do Meio, Rio Grande do Sul (Vale do Taquari, outubro 1974). In: CONGRESSO ESTADUAL DE SOVERGS, 3., 1975, Porto Alegre. *Anais...*, Porto Alegre: Comissão Científica do Congresso, 1975. p. 91-92.

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Pasteurella multocida*
ISOLADAS DE SUÍNOS COM PLEURITE**

ANA L. STEPAN¹, DAVID E. S. N. de BARCELLOS², SANDRA M. BOROWSKI³

RESUMO – São apresentados os resultados de sensibilidade “in vitro” a 8 antimicrobianos testados de 98 amostras de *Pasteurella multocida*, isoladas de pulmões de suínos com pleurite, abatidos em 4 frigoríficos do Estado do Rio Grande do Sul. O objetivo é o de auxiliar na escolha de princípios ativos a serem usados no controle dessas enfermidades respiratórias. Os menores índices de resistência ocorreram frente ao ácido oxolínico (2,1%) e ciprofloxacina (4,2%), sendo que os maiores percentuais de resistência foram observados frente a sulfazotrim (84,7%) e gentamicina (81,7%). Todas as cepas foram sensíveis pelo menos a dois entre os antimicrobianos testados. É discutida a importância terapêutica dos resultados obtidos.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, controle, antimicrobiano, suíno.

**ANTIMICROBIAL SENSITIVITY OF *Pasteurella multocida*
STRAINS ISOLATED FROM PLEURITIS IN PIGS**

ABSTRACT – We present the results of sensitivity tests of 98 strains of *Pasteurella multocida* against 8 antimicrobials. The bacteria derived from pig lungs with pleuritic lesions, collected in 4 slaughterhouses in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The objective of the present report was to assist in the choice of antimicrobial products to control respiratory diseases in pigs. The lowest resistance rates were observed with oxolinic acid (2.1%) and ciprofloxacin (4.2%), and the highest resistance rates with sulfazotrim (84.7%) and gentamycin (81.7%). All strains were sensitive at least against two drugs. We discuss the therapeutic relevance of the present results.

Key words: *Pasteurella multocida*, control, antimicrobials, pig.

INTRODUÇÃO

A *Pasteurella multocida* (Pm) é o agente etiológico de uma série de doenças em várias espécies animais de interesse econômico. Nos suínos é um habitante normal da cavidade nasal e um dos agentes etiológicos da Rinite Atrófica, em associação com a *Bordetella bronchiseptica* (DE JONG et al., 1984). A Pm também pode produzir pleurite fibrinosa e broncopneumonia purulenta (FARRINGTON, 1986). Nos últimos anos, muitos autores têm reportado isolamentos dessa bactéria de pulmões de suínos em vários países (PIJOAN et al., 1984; FALK et al., 1991). A doença afeta principalmente animais nas fases de crescimento e engorda e além dos prejuízos causados pelas condenações, interfere na produtividade, pois reduz o ganho de peso e piora a conversão alimentar. Segundo TAKOV et al. (1984) para cada 1% de comprometimento do parênquima pulmonar do suíno observado ao abate, perde-se 1 a 2 dias para atingir o peso final.

No controle das doenças respiratórias dos suínos, além das medidas profiláticas que envolvem correções ambientais e de manejo, a terapia antimicrobiana tem

se apresentado como uma medida complementar essencial. No entanto, para a sua realização, é preciso que se determine o espectro de sensibilidade do agente frente aos diferentes antibióticos e quimioterápicos disponíveis no mercado. Como existem deficiências de acesso à assistência laboratorial na maioria das áreas de criação do país, esse recurso muitas vezes é inexistente. Nesses casos, o conhecimento da atividade de diferentes antimicrobianos contra amostras isoladas de surtos ocorridos na região onde se pretende realizar o tratamento, pode servir como um indicador, auxiliando na seleção.

A sensibilidade “in vitro” da *Pasteurella multocida* tem sido determinada em diversos países, os resultados sugerem uma ampla variação regional, mas com padrões coincidentes para alguns princípios ativos. Por exemplo, trabalhando com 80 amostras de Pm isoladas de pulmões com pneumonia de suínos na Tailândia, AHN e KIM (1994) observaram que todas foram sensíveis à ciprofloxacina e a maioria foi resistente à sulfametoxina. AWAD-MASALMEH et al. (1994), analisando 160 amostras de Pm isoladas de pulmões pneumônicos de suínos na Áustria, observaram baixa resistência ao

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. Bolsista do CNPq.

2. Méd. Vet., M.Sc. – Professor da Faculdade de Veterinária da UFRGS e FFFCMPA, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

3. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor e FFFCMPA, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. Recebido para publicação em 25/11/1997.

cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazol + trimetoprim. Não foram encontrados na literatura consultada registros sobre padrões de sensibilidade "in vitro" de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em nosso meio.

No presente trabalho, foi avaliada pela técnica da difusão em disco a sensibilidade "in vitro" de amostras de Pm, isoladas de pulmões com lesões de pleurite, amostrados em frigoríficos no Rio Grande do Sul, frente a vários princípios ativos de antibióticos e quimioterápicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 98 amostras de Pm isoladas a partir de 230 pulmões coletados em 4 frigoríficos localizados em 3 diferentes zonas criatórias do Rio Grande do Sul (Alto Uruguai, Serra e Vale do Taquari).

O isolamento da bactéria foi efetuado conforme PIJOAN et al. (1984). Uma pequena porção de aproximadamente 1 cm³ de pulmão com lesão típica foi flambada com álcool, cortada e após foi feita uma impressão em meio de ágar com 5% de sangue ovino, em meio de Rutter, (RUTTER et al., 1984) e em ágar Mac Conkey e incubadas por 18 horas a 37 °C. Também 0,5 ml de suspensões desses fragmentos de pulmão em meio BHI foram inoculadas em camundongos de 21 dias de idade por via intraperitoneal. Foram analisadas as colônias obtidas nos cultivos diretos em placa e a partir da semeadura do fígado dos camundongos mortos em meio contendo sangue ovino a 5%. As colônias suspeitas, isto é, circulares, com 1 a 2 mm de diâmetro, sem hemólise, sem crescimento em ágar Mac Conkey, e que à coloração de Gram se apresentaram como cocobacilos Gram negativos foram submetidas a provas bioquímicas, conforme descrito em COWAN (1975).

O antibiograma foi realizado em ágar Mueller-Hinton com o uso da técnica de Kirby-Bauer, modificada por STOKES e WATWERWOTH (1972). Os seguintes discos foram usados, nas concentrações indicadas:

gentamicina, 10 mg; canamicina, 30 mg; sulfazotrim, 25 mg; ácido oxolínico, 30 mg; tetraciclina, 30 mg; cloranfenicol, 30 mg; ciprofloxacina, 5mg; danofloxacina, 5mg.

A seleção dos discos foi baseada no critério da disponibilidade comercial em nosso meio dos princípios ativos, como produtos em forma compatível para o controle das infecções respiratórias causadas pela Pm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de sensibilidade das amostras de Pm frente aos 8 princípios ativos testados são apresentados na Tabela 1 e Figura 1. Nenhuma das cepas se mostrou resistente a 100% dos antimicrobianos testados. Apenas uma cepa (1,03%) foi sensível a todos os antimicrobianos. Todas as cepas (100%) foram sensíveis a no mínimo duas drogas. Nos antibiogramas realizados, observou-se alta resistência das cepas frente à canamicina (72,45%), gentamicina (81,63%) e sulfazotrim (84,69%). Frente ao ácido oxolínico, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina e danofloxacina foram observadas taxas de resistência inferiores a 30,0%. Os resultados diferiram parcialmente dos obtidos por CORBOZ et al. (1992), que obtiveram os melhores resultados em termos de sensibilidade para o cloranfenicol e gentamicina.

É importante salientar que fatores adicionais à sensibilidade no laboratório irão determinar o sucesso ou falha da antibioticoterapia. LARSEN e SOGARD (1981) citam como exemplo a solubilidade, absorção, toxicidade, distribuição e excreção dos antimicrobianos no corpo do animal.

A explicação para o alto grau de resistência a determinadas drogas (como sulfazotrim, gentamicina e canamicina) não pode ser obtida pela análise dos dados obtidos. Entretanto, pode-se especular que haja relação com o uso freqüente destas drogas na prevenção e/ou tratamento das darréias em nosso meio.

TABELA 1 – Número e percentagem de cepas de *Pasteurella multocida* resistentes e sensíveis aos antimicrobianos testados

TIPOS DE ANTIMICROBIANOS	Nº AMOSTRAS TESTADAS	Nº AMOSTRAS RESISTENTES (%)	Nº AMOSTRAS SENSÍVEIS (%)
ÁC. OXOLÍNICO	97	02 (02,06)	95 (97,94)
CIPROFLOXACINA	96	04 (04,17)	92 (95,83)
CLORANFENICOL	98	15 (15,31)	83 (84,69)
TETRACICLINA	97	28 (28,87)	69 (71,13)
DANOFLOXACINA	97	29 (29,90)	68 (70,10)
CANAMICINA	98	71 (72,45)	27 (27,55)
GENTAMICINA	98	80 (81,63)	18 (18,37)
SULFAZOTRIN	98	83 (84,69)	15 (15,31)

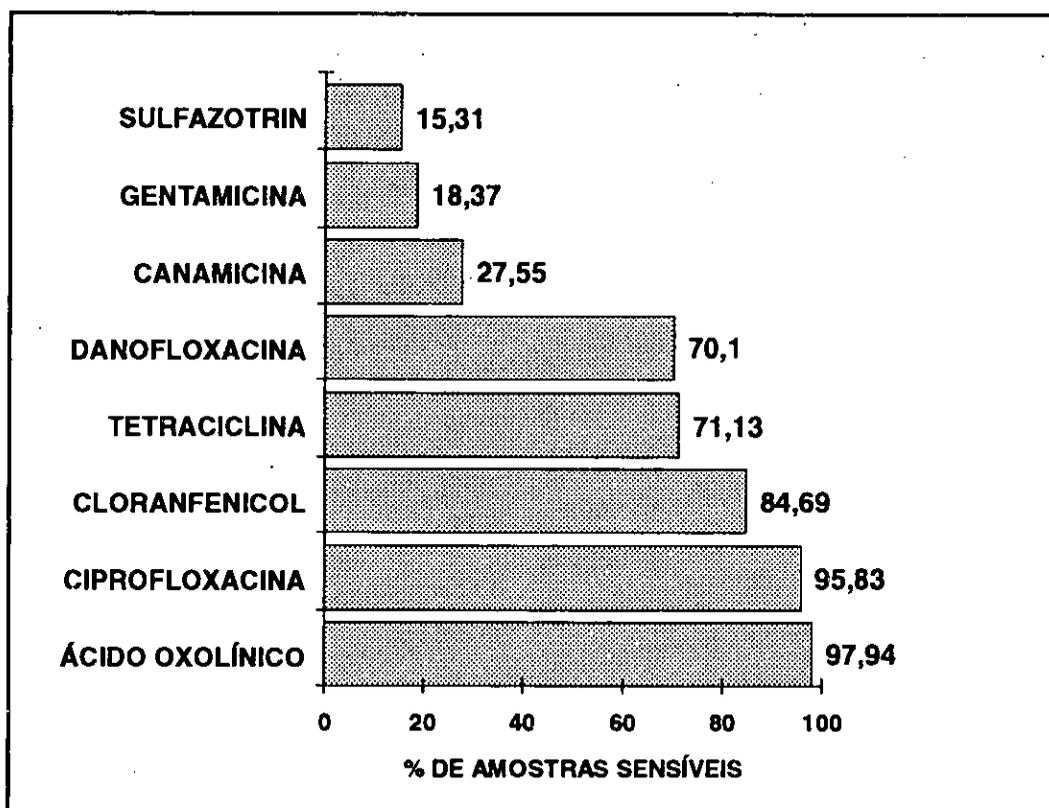


FIGURA 1 – Percentagem de amostras de *Pasteurella multocida* sensíveis aos antimicrobianos testados

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho podem servir como uma amostragem da resistência da Pm nas cepas estudadas, uma vez que as amplas variações encontradas não permitem a sua generalização. Dessa forma, seria recomendável a coleta de materiais e análise da resistência a partir das bactérias isoladas de cada surto, para permitir uma decisão correta sobre qual a melhor estratégia de tratamento a ser adotada.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AHN, B.C.; KIM, B.H. Toxigenicity and capsular serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lungs of slaughter pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 13., 1994, Bangkok. *Proceedings...* Bangkok, Poomvises and Pringsri Ingkanium, 1994. p.165.
- AWAD-MASALMEH, M.; KOUROUMA, G.; KÖFER, J.; SHUH, M. Investigations of *Pasteurella multocida* lesions of slaughter swine suffering from chronic respiratory disorders In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 13., 1994, Bangkok. *Proceedings...* Bangkok, Poomvises and Pringsri Ingkanium, 1994. p.172.
- CORBOZ, L.; BUERGI, E.; GRUBER, H.; GYSLING, P. Drug resistance of *Pasteurella multocida* strains isolated in Switzerland from the respiratory tract of pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague Animal Health Service in the Southern Netherlands, 1992. p.181.
- COWAN, S.T. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. 238 p.
- DE JONG, M.F.; OEI, J.L.; TESTENBURG, G.J. Ar-pathogenicity- tests for *Pasteurella multocida* isolates. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 6., 1984, Copenhagen. *Proceedings...* Copenhagen: Nielsen, N.C., 1984. p. 211.
- FALK, K.; HOIE, S.; LIUM, B.M. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 32, n.1, p. 67-77, 1991.
- FARRINGTON, D.O. In: Leman, A. (Eds.). *Diseases of swine*. 6.ed. Iowa: Iowa State University Press, 1986. p.378-385.
- LARSEN, J.L.; SOGARD, H. The susceptibility of enteropathogenic porcine *Escherichia coli* strains to polymixin and other antibiotics. *Nordisk Veterinärmedisin*, Oslo, v. 33, p. 393-402, 1981.

- PIJOAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C.; LEMAN, A.D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 185, n. 5, p. 522-523, 1984.
- RUTTER, J.M.; TAYLOR, R.J.; CRIGHTON, W.G.; ROBERTSON, I.B.; BENSON, J.A. Epidemiological study of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis. **Veterinary Record**, London, n.15, v.115, p. 615-619, Dec., 1984.
- STOKES, E.J.; WATERWOTH, P.M. **Association of clinical pathology**. London: Broadsheet 55, 1972. 4p.
- TAKOV, R.; WILSON, M.R.; BUTLER, A; FLIENSHIP, R.; HACKER, M.C.; MILLAN, I.; PIEPER, R.; WAMINATHAN, S. Interrelaciones entre enfermedad respiratoria, productiva e algunos factores de manejo en los porcinos de peso de mercado. In: **INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS**, 8., 1984, Ghent. **Proceedings...** Ghent, 1984. p.348.

INFLUÊNCIA DO USO DE ASPERSÕES COM DESINFETANTE SOBRE A OCORRÊNCIA DE TOSSE E ESPIRRÓS EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO

DAVID E.S.N. de BARCELLOS¹, SANDRA M. BOROWSKI², VERA WALD¹

RESUMO – A criação de suínos confinados gera um aumento na ocorrência de doenças respiratórias, principalmente pelo aumento da exposição dos animais a agentes patogênicos e pela deterioração das condições ambientais. Entre as medidas preventivas para o problema, tem sido descrito como eficiente o uso de aspersão com desinfetantes, visando a precipitação da poeira e a inativação da flora microbiana em suspensão no ar. No presente trabalho, foram realizados 7 experimentos com lotes de suínos na fase de terminação com o uso da aspersão de diferentes diluições do desinfetante Diguconato de Clorhexidina em dois regimes de aplicação (a cada 24 ou cada 48 h). Para estimar a eficiência dos tratamentos, foram medidos dois índices clínicos (frequência de tosse e de espirros). Através da análise estatística dos resultados, realizado pela análise da variância, se concluiu que: a) com relação à contagem de espirros, as aspersões a cada 24 h causaram em 6 dos 7 experimentos uma redução significativa dos sinais clínicos. Já com a aplicação a cada 48 h, o tratamento foi eficiente apenas com o produto mais concentrado pois, com exceção de um teste na diluição de 1:500, a redução só apareceu com o uso das menores diluições, 1:250. b) com relação à contagem de tosses, o uso de uma diluição muito alta (1:1800) não funcionou nem com intervalo de 24 ou de 48 h. Com exceção de um experimento (diluição 1:250 a cada 24 h), todas as outras diluições nos 2 esquemas de aplicação foram eficientes. Com base nesses dados, pode ser concluído que para o controle da sintomatologia de espirros, poderiam ser usadas diluições até 1:500 a cada 24 ou 48 h. Para o controle da sintomatologia de tosses os melhores resultados poderiam ser esperados com o uso da diluição de 1:500 a cada 24 ou 1:250 a cada 48 h.

Palavras-chave: Suíno, doença respiratória, controle, aspersão, desinfetante.

INFLUENCE OF SPRAYING WITH DISINFECTANTS ON SOME CLINICAL INDEXES IN PIG PRODUCTION

ABSTRACT – The use of intensive pig production systems tends to increase prevalence and severity of respiratory diseases, directly correlated with increased exposure to infectious agents and worsening of environmental conditions. Among suggested control measures, the use of aerosols of disinfectants was shown to be effective. Its use objectives dust precipitation and bacterial flora inactivation. In the present work, 7 experiments were carried out using finishing pigs subjected to spraying with different dilution of a disinfectant (Chlorhexidine), at 24 or 48 hour intervals. To assess the efficiency of the treatments, two clinical indexes were measured: sneeze and cough counts. Through statistical analysis, the main conclusions drawn from the results were: a) regarding cough counts, aspersion at 24 hour intervals resulted in a significant reduction in symptoms in 6 out of 7 groups. In the 48 hour groups, only the concentrated solution was efficient. In this case, excepting one treatment with 1:500 dilution, a decrease in symptoms was only observed at the lowest dilution, 1:250. b) Regarding sneeze counts, the use of the highest dilution (1:1800) didn't work at 24 or 48 hour intervals. Excepting one group (1:250 at 24 hour interval), all dilution in the 2 regimes of use (24 or 48 h) were efficient to reduce symptoms. Based in these data, it is concluded that symptoms of sneeze could be reduced using dilutions up to 1:500 every 24 or 48 hours. To cough control, the best results could be expected using a 1:500 dilution every 24 hours or 1:250 every 48 hours.

Key words: respiratory diseases, control, disinfectant sprays, pigs.

INTRODUÇÃO

A criação de suínos em sistemas intensivos implica, em muitas ocasiões, numa superpopulação das instalações e em movimentação restrita do ar, gerando condições favoráveis à difusão de agentes patogênicos. Ao serem criados animais nessas condições, as perdas produtivas por mortalidade ou redução na taxa de crescimento são consideráveis, (DERBISHIRE, 1971).

Quando existe uma densidade animal excessiva numa instalação ou no caso de movimentação insuficiente de ar, criam-se condições favoráveis para a transmissão de agentes patogênicos entre animais doentes e sadios. É geralmente aceito que os microorganismos se movimentam através do ar, no núcleo de partículas líquidas (na forma de aerossóis) ou na poeira, (DONALDSON, 1978). Nas granjas de suínos, esse tipo de transmissão assume importância em determinadas

1. Méd. Vet., M.Sc. – Prof. da Faculdade de Veterinária da UFRGS e FFFCMPA, Av. Bento Gonçalves 9090, 95140-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet., M.Sc. - FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL e FFFCMPA

Recebido para publicação em 25/11/1997.

infecções respiratórias como, por exemplo, a pneumonia micoplásmica, pasteurelose pulmonar e pleuropneumonia causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Nas infecções com origem aerógena, a dose infectante na maioria dos casos determinará a ocorrência ou não da doença e a sua gravidade. Dessa forma, as perdas determinadas, pelas mesmas, podem ser minimizadas, se for mantida baixa a exposição dos animais aos patógenos presentes no ar. Entre as medidas que podem ser usadas, são citadas as seguintes: subdivisão das instalações em salas menores, o isolamento dos animais doentes, a correção da ventilação e o uso de métodos que visam a precipitação da poeira e a inativação da flora microbiana em suspensão no ar. Para conseguir esse último intento, pode-se usar aspersões com água com a adição de produtos com ação desinfetante ou antimicrobiana. As vantagens obtidas são:

a) Redução na concentração de poeira das instalações:

Segundo AENGST (1984), os elementos integrantes da poeira em granjas de suínos são a água (13,1%) e matéria seca (86,9%). Na mesma, encontra-se cinzas (14,6%), proteína bruta (23,9%), gorduras (4,3%) e fibra (3,4%). Medindo gravimetricamente o nível de poeira nas instalações, encontrou níveis diários médios 2,61g/m². RYHR- ANDERSSON (1990) estudou o efeito da aspersão com água como meio de reduzir a concentração de poeira em instalações ocupadas com leitões na fase de crescimento. O volume testado foi de 0,3 litros/m², usando 6, 9 e 36 aplicações diárias. As diminuições nos níveis de poeira foram respectivamente 15, 48 e 73%. Observou-se uma queda na ocorrência de pleurite nos grupos de animais alojados nas instalações tratadas.

b) Redução na concentração de microorganismos nas instalações:

THIEMANN e WILLINGER (1977) testaram o uso de aspersões com desinfetantes iodados em instalações de engorda ocupadas em relação ao conteúdo quantitativo e qualitativo da flora bacteriana presente nas mesmas. As concentrações utilizadas foram 0,6%, 1%, 2%, 3% e 6% e o número de bactérias, por volume de ar, presente, nas instalações, antes da aplicação do produto variava entre 200 a 500 UFC/l (Unidades formadoras de colônia/ litro), consistindo principalmente de *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia (E.) coli* e fungos. Não foram registrados efeitos significativos com o uso das concentrações 0,6 e 1%, mas as soluções a 2 e 3% causaram uma redução de até 71% nos títulos bacterianos. A solução a 6% se apresentou irritante aos animais. Ocorreu também uma significativa mudança na composição da flora microbiana, com o desaparecimento da *E. coli* e fungos.

Num trabalho similar, BERNER e JACKEL (1976) testaram o uso de aspersão profilática com desinfetante à base de fenóis e cresóis em relação à flora microbiana de maternidades. O processo foi considerado útil, apenas nas áreas com baixa presença de matéria orgânica (fezes). Um outro tipo de possibilidade foi testada, através da aspersão com diferentes produtos antimicrobianos (oxitetraciclina, neomicina e sulfatiazol), dissolvidos a 1% em solução de glicerina e água em 8 a 10 aplicações com 40 a 60 minutos de duração (GLADENKO et al., 1976). O tratamento implicou numa penetração direta dos princípios ativos em áreas pulmonares inflamadas, sendo particularmente efetivo na presença de doença pulmonar crônica.

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o efeito do uso de aspersões com um desinfetante com amplo espectro bactericida e fungicida e de baixa toxicidade para animais e seres humanos, sobre a ocorrência de tosse e espirros em animais na fase de terminação

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em granja de porte industrial de ciclo completo, situada na região das Missões, RS. Havia na mesma diagnóstico clínico e laboratorial de Rinite Atrófica Progressiva, Pneumonia Enzoótica, Pleuropneumonia e Pasteurelose Pulmonar. Os prédios possuíam 22 boxes a cada lado de um corredor central, com telhado de telhas de barro. O piso era do tipo misto (sólido na frente com ripado de concreto no terço posterior). Em cada box foram alojados 10 animais (das raças Landrace, Large White, Duroc ou seus cruzamentos). No início do teste os leitões tinham aproximadamente 75/90 dias de idade (25 a 35 kg) e foram examinados até a saída para o abate aos 165-180 dias de idade (95 a 105 kg). Foram realizados 7 testes, cada um contando com 2 grupos testemunhos e 2 grupos como tratamentos (usando aspersões com 80 ml/m² de Digluconato de Clorhexidina*, um com aspersão diária e o outro com a aplicação a cada dois dias). As diluições usadas nos tratamentos foram as seguintes: Tratamento 1- 1:1800; 2- 1:500; 3- 1:500; 4- 1:400; 5- 1:300; 6- 1:250; 7- 1:250. Em cada um dos tratamentos foram usados 2 x 12 boxes (controles) e 2 x 10 boxes (aspersões). Em cada box foram alojados 10 leitões, de forma que para cada um dos 7 experimentos foram utilizados 440 leitões (num total geral de 3080 leitões). A área média disponível era de 0,8 m² por leitão. Cada galpão media 81 x 10 m, sendo pois a área total do galpão de 810 m². Cada box media 4,5 x 4,5 m² (área interna total de 20,25 m²).

A pulverização foi realizada em cada box, usando-

*Sterilan-RDM

se $0,08 \text{ l} \times 20,25 \text{ m}^2 = 1,62$ litros em cada box por aplicação. O volume de produto utilizado foi de 80 ml por m^2 de piso (considerando a metragem interna total do piso das instalações). A aspersão foi realizada na altura dos animais, a aproximadamente 50 cm de altura. Durante os experimentos, os animais receberam ração sem adição de produtos antimicrobianos. Para avaliação dos resultados dos testes foram medidos diariamente os escores de tosses e de espirros, de acordo com os critérios sugeridos por DOUGLAS e RIPLEY (1984). Foram contadas tosses e espirros três vezes ao dia, expressando os resultados como média de tosses ou espirros por

lote de 100 animais por três minutos. Os animais foram examinados, no mínimo, 4 vezes por semana durante o experimento. A análise estatística dos dados foi realizada com o uso da análise da variância, através do teste F. Quando registradas diferenças entre os tratamentos, a comparação das médias foi realizada com o uso do teste Bonferroni.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise clínica e na avaliação estatística constam da Tabela 1.

TABELA 1 – Resultado do uso da aspersão com Diguconato de Clorhexidina em diferentes diluições sobre a ocorrência de tosse e espirros em animais na fase de terminação

Experimento N ^o	Diluição do desinfetante	Resultados para espirros			Resultados para tosses		
		24/24 h	48/48 h	Controle	24/24 h	48/48 h	Controle
1	1:1800	6,03 ^a	5,68	4,23	1,63	1,46	1,87
2	1:500	2,32 ^a	2,96	3,97	0,95 ^{ab}	1,54 ^a	2,24
3	1:500	2,01 ^a	1,8 ^a	2,96	1,61 ^a	1,43 ^a	3,59
4	1:400	0,56 ^a	0,72	1,02	4,18 ^a	3,97 ^a	4,9
5	1:300	1,83 ^a	1,92	2,61	2,97 ^a	3,75 ^a	7,52
6	1:250	3,25	2,18 ^a	3,95	1,71 ^b	1,03 ^{ab}	2,15
7	1:250	2,65 ^a	2,55 ^a	6,05	0,83 ^a	0,81 ^a	1,55

a = diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e os controles;

b = diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos entre si;

ab = diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si (24/24 e 48/48 h).

Pela análise da tabela se pode observar:

a) com relação à contagem de espirros, as aspersões a cada 24 h causaram em 6 dos 7 experimentos uma redução significativa dos sintomas. Já com a aplicação a cada 48 h, aparentemente a pulverização foi eficiente apenas com o produto mais concentrado (pois com exceção de um teste na diluição de 1:500, a redução só apareceu com o uso das menores diluições, 1:250).

b) com relação à contagem de tosses, o uso da diluição 1:1800 não funcionou nem com intervalo de 24 ou de 48 h. Com exceção de um experimento (diluição 1:250 a cada 24 h), as demais diluições (1:250, 1:300, 1:400 e 1:500) se mostraram eficientes nos 2 esquemas de aplicação.

De forma geral, os índices encontrados não diferiram muito daqueles descritos por DOUGLAS e RIPLEY, (1984). Nesse trabalho, valores de tosse e de espirros abaixo de 1% por minuto para um lote de 100 animais foram considerados como "normais", entre 1 a 3% de "média gravidade" e acima de 3% considerados "graves". Os nossos resultados foram expressos numa

base de 3 minutos, sendo necessária uma correção para a comparação dos dados. De acordo com esses critérios, os tratamentos que resultaram numa redução estatisticamente significativa dos sintomas em análise tenderam a deslocar os quadros clínicos da faixa de "média gravidade" para a faixa considerada como "normal".

A maneira como teria agido a aspersão e o desinfetante no sentido de determinar a redução dos sintomas, não pode ser definida com os dados atuais. Pode-se especular que a queda nos níveis de poeira do ambiente e de patógenos no ar tenha resultado numa redução da agressão respiratória, com reflexo nos sintomas.

CONCLUSÕES

Os testes demonstraram a utilidade das aspersões em reduzir a frequência de tosse e espirros, indicando a conveniência do uso desse tipo de metodologia como um método de apoio no controle das doenças respiratórias dos suínos.

Com base nos dados obtidos, pode ser concluído que para o controle da sintomatologia de espirros,

poderia ser usada uma diluição a partir de 1:500 a cada 24 h ou 1:250 a cada 24 h. Para o controle da sintomatologia de tosses os melhores resultados são atingidos com o uso da diluição de 1:500 a cada 24 ou 1:250 a cada 48 h.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AENGST, C. **Composition of dust in a pig fattening house.** Hannover: Tierärztliche Hochschule, 1984. 57 p. Thesis, Tierärztliche Hochschule. 1984.
- BERNER, H.; JACKEL, A. Problem of continuous disinfection in farrowing houses. *Tierärztliche-Umschau*, Hannover, v.31, n.2, p. 59-66, 1976.
- DERBISHIRE, J.B. Microbial disease and animal productivity. In: **Microbes and Biological Productivity.** Cambridge: Cambridge University Press, 1971, p. 125- 147.
- DONALDSON, A.I. Factors influencing the dispersal, survival and deposition of airborne pathogens of farm animals. *The Veterinary Bulletin*, Surrey, v. 48, n.2, p. 83-94, 1978.
- DOUGLAS, R.G.A.; RIPLEY, P.H. Sneeze counts as a diagnostic aid in pig production. *The Veterinary Record*, London, v.114, p. 321-322, 1984.
- GLADENKO, I.N.; FORTUSHNYI, V.A.; VASILEV, S.I.; SHULIAK, V.D. Use of aerosols of therapeutic substances in pneumonia in pigs. *Veterinaria Moscow*, Moscow, v.4, p. 93-97, 1976.
- RYHR-ANDERSSON, E. Showering in house for growing pigs- effects on dust concentration and animal health. **Specialmeddelande - Institutionen for Lantbrukets Byggnadsteknik, Sveriges, Sveridge**, n.176, 1990, 118 p.
- THIEMAN, G.; WILLINGER, H. Periodic spray disinfection of piggeries during fattening. *Wiener Tierärztliche - Monatsschrift*, Wiene, v.64, n.3, p. 82-85, 1977.

OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *TOXOPLASMA GONDII* EM OVINOS NO MUNICÍPIO DE LIVRAMENTO, RS: PREVALÊNCIA E IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

JOÃO RICARDO MARTINS¹, ROGER HANCOCK², BARTOLOMEU LIMA CORRÊA¹, VICTOR HERMES CERESÉR¹

RESUMO – Realizou-se um levantamento sorológico visando a detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em cinco rebanhos ovinos no município de Livramento, RS, utilizando-se o teste de aglutinação em látex. Foram detectados anticorpos que variaram em um percentual entre 21 e 61% das amostras examinadas. A presença de gatos foi confirmada em todas as propriedades. Não houve registro de abortos pelos proprietários nos últimos anos, embora houvesse relato de natimortos em todas as propriedades. As possíveis causas para este fato são discutidas, bem como alguns aspectos da epidemiologia da enfermidade.

Palavras-chave: ovino, toxoplasmose, anticorpo.

OCCURENCE OF ANTIBODIES TO *TOXOPLASMA GONDII* IN FLOCKS OF SHEEP IN THE DISTRICT OF LIVRAMENTO, RS: PREVALENCE AND EPIDEMIOLOGICAL IMPLICATION

ABSTRACT – A survey aiming to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in five flocks of sheep in the district of Livramento, State of Rio Grande do Sul, was performed using the Latex Agglutination Test. Antibodies were detected ranging from 21 to 61% in the examined samples. Presence of cats was confirmed in all the properties. Cases of abortion were not observed although stillbirths were notified in all the farms. Possible causes of these observations are discussed as well as some aspects of the illness.

Key words: sheep, toxoplasmosis, antibody.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário cosmopolita que ocorre em mamíferos na fase intermediária e tem nos felídeos, especialmente no gato doméstico, o seu hospedeiro definitivo. É uma zoonose, sendo responsável por até um terço das causas de aborto em ovelhas na Grã-Bretanha (VIDA II, 1984). No Estado do Rio Grande do Sul, sua importância em abortos de ovinos ainda não foi determinada, não havendo relatos de surtos da enfermidade em ovinos, embora SILVA et al. (1980), SILVA et al. (1981) e ZONTA et al. (1987/8) tenham relatado a presença de anticorpos contra *Toxoplasma* em 4 municípios do Rio Grande do Sul e FILHA et al. (1992) tenham isolado o parasita a partir de músculos diafragmáticos de ovinos abatidos em matadouros de São Paulo e procedentes do Rio Grande do Sul. Na Grã-Bretanha, a epidemiologia da toxoplasmose pode ser melhor compreendida, pois o manejo dos ovinos envolve um relacionamento estreito com as habitações, estoques de feno e forragens, os quais podem ser facilmente contaminados por oocistos oriundos de gatos domésticos. A única fonte aceitável de infecção para os herbí-

voros são os oocistos infectantes eliminados pelos felinos. Entretanto, o modo de aquisição da infecção e o período em que as ovelhas se infectam, são fatores epidemiológicos que podem determinar esquemas específicos de controle para contornar cada situação em particular (FAULL et al., 1986).

A presente investigação consistiu na realização de um levantamento sorológico realizado em cinco propriedades a fim de identificar ovelhas portadoras de anticorpos contra *T. gondii*, e de um inquérito epidemiológico nas mesmas propriedades para se determinar, ou não, evidências de perdas reprodutivas que pudessem levar à suspeita da enfermidade nos rebanhos examinados. Neste caso, a presença de fatores epidemiológicos associados a surtos de toxoplasmose, em outras localidades, foi também investigada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Propriedades: as cinco propriedades são produtoras de lã e carne, com os rebanhos estabelecidos há vários anos no município de Livramento, RS. Detalhes dos números de ovinos em cada rebanho são apresentados na Tabela 1. A substituição do rebanho em repro-

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet. – Overseas Development Administration, Eland House, Stag Place, London, SW 1E 5DH, Grã-Bretanha.
Recebido para publicação em 25/11/1997.

dução é realizada com ovinos nascidos nas mesmas propriedades, com exceção dos carneiros, os quais são adquiridos ocasionalmente de outros criadores locais. Nas

propriedades A e B, os ovinos pertenciam à raça *Corriedale*, na C, *Corriedale e Ideal*, enquanto que na D e E, *Ideal*.

TABELA 1 – Resultados do inquérito sorológico para pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos no município de Livramento, RS

PROPRIEDADE	OVINOS (TOTAL)	AMOSTRAS COLETADAS	POSITIVAS		GATOS (n)
			(n°)	(%)	
A	32	21	13	(61,9%)	2
B	132	29	9	(31%)	?*
C	1100	32	7	(21,8%)	3
D	820	34	9	(26,4%)	30
E	300	28	6	(21,4%)	?*
TOTAL	2384	144		44	–

* Proprietário admite a presença de gatos mas não soube quantificá-los.

Seleção das ovelhas e amostragem dos animais: as ovelhas foram selecionadas por acaso, utilizando-se a tabela de THRUSFIELD (1986). O número de amostras foi suficiente para assegurar que, pelo menos, uma amostra positiva fosse detectada se a soroprevalência fosse igual ou maior que 10%, com uma confiança de 95%.

Colheita das amostras e exame laboratorial: os soros foram coletados em tubos “vacutainer”, 5 ml, devidamente identificados, onde após a separação do coágulo, foram transportados ao laboratório e armazenados a -20 °C até a realização dos testes. O método de diagnóstico empregado foi o teste de aglutinação em látex, seguindo-se as instruções do laboratório fabricante (EIKEN Chemical Co., Ltda, Japan). Utilizou-se microplacas Nunc, 96 orifícios, fundo em U (*Flow lab.*, USA) para a execução dos testes. Foram considerados positivos os soros com títulos igual ou acima de 1:64 (TREES et al., 1989).

Inquérito epidemiológico: inquiriu-se os proprietários sobre a ocorrência de casos de abortos em anos recentes. No ano de 1990, nas propriedades C e D, foram coletados dados detalhados de perdas reprodutivas durante o período de parição como parte de uma outra investigação. Os proprietários também foram indagados sobre a presença de gatos nas propriedades, fornecimento de alimentação concentrada ou feno com suplementação alimentar em algum período do ano e se os ovinos eram estabulados para atender algum tipo de manejo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados sorológicos: animais soropositivos foram detectados nos cinco rebanhos (Tabela 1), indi-

cando uma soroprevalência superior a 10%. A percentagem de positividade em cada grupo selecionado ao acaso, variou entre 21 e 61%.

Resultados epidemiológicos: em nenhuma das propriedades foi reportado aborto pelo proprietário, ao contrário de registro de natimortos, situação relatada em todas as propriedades. A presença de gatos foi constante (Tabela 1) sugerindo as possíveis fontes de infecção. O manejo aplicado é tipicamente extensivo, sendo que nenhum proprietário relatou suplementar os ovinos com concentrado ou feno em qualquer época do ano. O período de convívio doméstico com os ovinos limitou-se a períodos de everminações, tosquia, desmame, castração e vacinações, onde o tempo de permanência próximo a residência nunca é superior a 24 horas.

O teste de aglutinação pelo látex, é descrito como uma prova confiável quando aplicado sobre soros de ovinos infectados por oocistos (TREES et al., 1989).

Os resultados mostraram que nos cinco rebanhos examinados, mais de 10% das ovelhas haviam sido expostas ao *T. gondii*. Este achado concorda com o encontrado por outros trabalhos no RS (ZONTA et al., 1987/88; SILVA et al., 1981; LARSON et al., 1979), embora prevalências mais baixas tenham sido detectadas em algumas áreas (SILVA et al., 1980; SILVA et al., 1984). Os resultados também são similares a dados de levantamentos em outros países. Inquéritos sorológicos realizados na Escócia, Inglaterra, Nova Zelândia e Austrália, evidenciaram uma soroprevalência entre 10 e 30% (BLEWETT e WATSON, 1984). Embora não tenha sido possível calcular a prevalência exata dos rebanhos ovinos nesta investigação, a alta percentagem de soros positivos observados sugere que anticorpos podem estar presentes nos rebanhos com prevalências superiores a

10%. O exame sorológico de ovinos é útil em excluir a toxoplasmose como causa de aborto, tendo em vista que os anticorpos apresentam sempre um pico antes de ocorrer o aborto (DUBEY et al., 1987). Nenhum dos rebanhos teve histórico de surtos isolados de abortos. BLEWETT e WATSON (1984) sugeriram que um típico surto isolado de toxoplasmose clínica causando aborto, mal-formação fetal e morte neonatal, afetando ovelhas de todos os grupos de idade, está associado a uma exposição descontínua das ovelhas ao organismo. Este fato ocorre quando alimentos contaminados com fezes de gatos são fornecidos às ovelhas entre o terço inicial e final da gestação ou quando camas de ovinos estabulados, igualmente contaminadas com oocistos são pulverizadas sobre pastagens utilizadas por ovelhas prenhes suscetíveis (FAULL et al., 1986). Os resultados do inquérito epidemiológico mostraram que, nestas propriedades, nenhuma destas condições estava presente. É possível que os rebanhos estivessem sujeitos a uma contínua exposição a baixo número de organismos em consequência da defecação de gatos sobre as pastagens e nos poteiros e mangueiras usados pelos ovinos. Isto resultaria em toxoplasmose clínica e afetaria somente as borregas suscetíveis ou qualquer ovino adquirido e não exposto anteriormente à infecção. Em razão de que somente uma pequena proporção precisa necessariamente adquirir a infecção durante a gestação, o número de casos clínicos é pequeno e poderia não ser detectado nestas propriedades onde a criação é extensiva. Alternativamente, uma infecção com um pequeno número de oocistos (entre o período de nascimento e o reprodutivo) imunizaria as borregas. Para explorar esta possibilidade, trabalho adicional é necessário a fim de se estabelecer a prevalência da infecção em diferentes grupos de idade dentro dos rebanhos. Se a hipótese for verdadeira, a soroprevalência aumentaria com a idade dos animais expostos dentro dos rebanhos. Neste caso, a possibilidade da ocorrência de surtos de toxoplasmose clínica nestes rebanhos é pequena. Por outro lado, nas cinco propriedades examinadas, para melhor compreender a epidemiologia da infecção, seria interessante observar a prevalência de anticorpos em outras espécies animais presentes nas propriedades, embora os ovinos revelem mais anticorpos do que outras espécies.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BLEWETT, D.A.; WATSON, W.A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. III. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanism of transmission. *British Veterinary Journal*, London, v.140, n. 4, p. 54-63, 1984.
- DUBEY, J.B.; EMOND, J.P.; DESMONTS, G.; ANDERSON, W.R. Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v.48, n. 8, p.1239-1243, 1987.
- FAULL, W.B.; CLARKSON, M.J.; WINTER, A.C. Toxoplasmosis in a flock of sheep: some investigations into its source and control. *Veterinary Record*, v. 119, p. 491-493, 1986.
- FILHA, E.S.; AMARAL, V.; MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M.M.; SANTOS, S.M.; DRUMOND, L.S. *Toxoplasma gondii* em ovinos: isolamento do parasita a partir de diafragmas de animais procedentes do Estado do Rio Grande do Sul e abatidos em matadouros de São Paulo, para consumo humano. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v.1, n. 2, p.117-119, 1992.
- LARSON, C.E. Prevalência de anticorpos antitoxoplásmicos determinados pela reação de Sabin-Feldman em ovinos de Uruguaiana (RS). In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, Anais... Gramado, 1979.
- SILVA, N.R.S.; COSTA, A.J.; SOUZA, S.M.G. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em ovinos determinados pela reação de imunofluorescência Indireta no município de São Lourenço do Sul, RS. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v. 8, p. 89, 1980.
- SILVA, N.R.S.; COSTA, A.J.; CHAPLIN, E.L.; SOUZA, S.M.G. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de ovinos pela reação de imunofluorescência indireta na região de Guaíba, RS. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v. 9, p. 101, 1981.
- SILVA, S.; PIVATTO, I.; NISHIKAWA, H.; ARNONI, J.V.; RASSIER, D.S.S. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em animais domésticos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19., 1984. Anais... Belém, Sociedade dos Médicos Veterinários do Pará, 1984, p.130.
- THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. London: Butterworth & Co., 1986. 154 p.
- TREES, A.J.; CROZIER, S.J.; BUXTON, D.; BLEWETT, D.A. Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis: an assessment of the latex agglutination test and the value of IgM specific titres after experimental oocyst-induced infection. *Research in Veterinary Science*, London, v. 46, n.1, p. 67, 1989.
- VIDA II. *Veterinary Investigation Diagnosis Analysis II. Annual Report*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Weybridge, 1984, p. 35.
- ZONTA, J.C.; ARAÚJO, F.A.P.; STOBBE, N.S.; CHAPLIN, E.L.; SILVA, N.R.S. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em ovinos de Marau e Uruguaiana, RS. (Comunicação científica). *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, Porto Alegre, v. 15/16, p. 59- 61, 1987/88.

HIPEROSTOSE CONGÊNITA EM LEITÕES NO RIO GRANDE DO SUL

LUIZ CESAR B. FALLAVENA^{1,2}, DAVID E. S. N. de BARCELLOS³, NORMA C. RODRIGUES^{1,2}, SANDRA M. BOROWSKI¹

RESUMO – O presente relato registra a ocorrência de hiperostose congênita em leitões, no Rio Grande do Sul. São apresentados dados relativos à história clínica e às lesões macroscópicas e microscópicas em dois animais recém-nascidos recebidos no Laboratório de Patologia Suína do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, em Eldorado do Sul.

Palavras-chave: Doença animal; suínos; hiperostose congênita; distúrbio genético.

CONGENITAL HYPEROSTOSIS IN PIGLETS IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL

ABSTRACT – The occurrence of congenital hyperostosis in piglets in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, is described. The clinical history and macroscopic and microscopic changes in two newborn pigs submitted to the Laboratory of Swine Pathology of the Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor are presented.

Key words: Congenital diseases in pigs; Congenital hyperostosis.

INTRODUÇÃO

A hiperostose congênita ou “pernas engrossadas” (“thick legs”) é uma anormalidade anatômica caracterizada por aumento no diâmetro dos membros locomotores anteriores envolvendo especialmente a região rádio-ulnar, a qual pode atingir o dobro da sua espessura normal (KAYE, 1962). A pele na região afetada apresenta-se lustrosa e hiperêmica, havendo edema no tecido subcutâneo. À necropsia, observa-se um aumento pronunciado na espessura dos tecidos moles periosteais, principalmente na superfície cranial dos membros anteriores. A gênese e a evolução das lesões parecem resultar de um defeito inicial no local de inserção do perióstio à epífise óssea, ocorrendo uma separação que resultaria no aparecimento de trabéculas supranumerárias de osso imaturo (DOIZÉ e MARTINEAU, 1984).

A afecção é de origem genética, estando implicado um gene autossômico recessivo, o qual atuaria como letal quando no estado homocigótico (MORILL, 1947; DOIZÉ e MARTINEAU, 1984). Na grande maioria dos casos, a alteração leva à morte em poucos dias após o nascimento, presumivelmente por inanição ou insuficiência cardíaca (DOIZÉ e MARTINEAU, 1984).

De acordo com DOIZÉ e MARTINEAU (1984), pesquisadores europeus conseguiram criar uma fêmea afetada da doença até a fase adulta. Entretanto, embora as lesões tivessem regredido, esse animal era estéril e apresentava aderências uterinas e mal-formações ovariárias.

O presente relato objetiva o registro da ocorrência dessa anormalidade em leitões no Rio Grande do Sul.

DESCRIÇÃO DO CASO

O problema ocorreu em granja suíncola de porte industrial com aproximadamente 1.300 matrizes situada na região criatória do Alto Uruguai, RS. Em um período de 18 meses, dez leitegadas apresentaram entre um e três leitões afetados, a maioria dos casos evoluindo para a morte em dois a seis dias após o nascimento. Entretanto, às custas de um manejo extremamente intensivo, foi possível criar dois animais até a idade de abate. Os animais eram oriundos de cruzamentos aleatórios que eram realizados há vários anos, entre reprodutores das raças Duroc, Landrace e Large White, não havendo controle de filiação ou de genealogia.

Dois leitões recém-nascidos foram recebidos no laboratório; um havia morrido 24 horas após o parto e o outro, 36 horas após o nascimento. À exceção da anormalidade nos membros locomotores anteriores, não apresentavam outras alterações.

Em ambos os animais, a região rádio-ulnar apresentava-se bilateralmente aumentada em diâmetro, exibindo consistência firme e a pele, na área afetada, estava hiperêmica e aderida ao tecido subcutâneo. Os membros locomotores foram seccionados longitudinalmente por meio de serra para ossos; a seguir, as secções foram fixadas em solução de formalina a 10% por um período de 15 dias, descalcificadas em solução de formol-ácido fórmico, processadas segundo as técnicas

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor-CPVDF-, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet., M.Sc. – Prof. Adjunto do Curso de Medicina Veterinária da ULBRA, Caixa Postal 124, 92420-280 Canoas – RS/BRASIL.

3. Méd. Vet., M.Sc. – Prof. Adjunto da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 95140-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

histológicas rotineiras, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e examinadas ao microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame de necropsia não evidenciou alterações significativas, à exceção daquelas presentes nos membros locomotores anteriores.

Macroscopicamente, após a secção longitudinal, os membros locomotores revelaram a presença de um tecido de coloração brancacenta aparentemente avascularizado e de aspecto semelhante ao do tecido conjuntivo fibroso, disposto de forma a contornar os ossos da região afetada. A alteração era mais pronunciada na face anterior dos membros, atingindo desde a epífise proximal do rádio até a distal do metacarpo e invadindo os músculos adjacentes.

Histologicamente, externamente à camada cortical normal, haviam numerosas trabéculas de osso imaturo neoformado e adicional, orientadas radialmente a partir do perióstio, o qual continha numerosos osteoblastos de aspecto degenerado e estava circundado por uma espessa camada de fibroblastos que infiltrava os tecidos muscular e subcutâneo adjacentes. Secções longitudinais mostraram que as alterações não se estendiam proximalmente além das placas epifisárias dos ossos afetados, estando o anel pericondral espesso e exibindo forma triangular devido ao acúmulo de trabéculas ósseas delgadas de origem periosteal. As secções transversais obtidas através da diáfise do rádio e da ulna não mostraram alterações na cavidade medular ou no córtex original.

Os sinais clínicos observados, assim como as alterações macroscópicas e microscópicas, são compatíveis com as descritas por KAYE (1962) e por DOIZÉ e MARTINEAU (1984), permitindo diagnosticar a anormalidade descrita no presente relato como hiperostose congênita. Como na granja de origem dos leitões os cruzamentos eram realizados sem nenhum controle de filiação ou de genealogia, a hipótese de etiologia genética da doença parece provável. No relato presente, a causa da morte dos leitões afetados da anormalidade pareceu dever-se à inanição, já que os animais eram fracos e apresentavam dificuldade em mamar normalmente.

CONCLUSÕES

As alterações macroscópicas e microscópicas, associadas ao histórico da propriedade, permitiram o diagnóstico de hiperostose congênita em dois leitões provenientes de granja no Rio Grande do Sul.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- DOIZÉ, B.; MARTINEAU, G.-P. Congenital hyperostosis in piglets: a consequence of a disorganization of the perichondrial ossification groove of Ranvier. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Ottawa, n. 48, p. 414-419, 1984.
- KAYE, M.M. Hyperostosis in newborn pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Ottawa, n. 26, p. 218-221, 1962.
- LUNA, L.G. *Manual of histological staining methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1968.
- MORILL, C.C. Thick forelegs in baby pigs. *North American Veterinarian*, Iowa, n. 28, p. 738, 1947.

PAPILOMATOSE CUTÂNEA EM SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL

LUIZ CESAR B. FALLAVENA^{1,2}, NORMA CENTENO RODRIGUES^{1,2}, DAVID E.S.N. de BARCELLOS³

RESUMO – O presente relato registra a ocorrência de quatro casos de neoplasia cutânea com características de papiloma em suínos. São descritos os achados macroscópicos e histopatológicos.

Palavras-chave: Neoplasia suína; Papilomatose cutânea

CUTANEOUS PAPILOMATOSIS IN PIGS

ABSTRACT – The occurrence of neoplastic changes diagnosed as cutaneous papillomas in four pigs is described. The macroscopic and histological lesions are presented.

Key words: Swine neoplasia; Cutaneous papillomatosis

INTRODUÇÃO

A ocorrência de neoplasias em suínos é rara. COTCHIN (1962), analisando dados de inspeção em frigoríficos nos Estados Unidos da América, relativos à aproximadamente 57 milhões de carcaças, encontrou uma prevalência de 0,00035%. Uma possível explicação para essa baixa ocorrência é o abate dos animais em idade precoce (inferior a seis meses) e o descarte de matrizes e reprodutores antes que estes atinjam a senilidade (CIRIO et al., 1991). De acordo com MOULTON (1978), os linfossarcomas e os nefroblastomas são as neoplasias mais comuns nessa espécie animal, correspondendo aproximadamente a 40% dos diagnósticos.

No Brasil, CIRIO et al. (1991) analisaram a ocorrência de neoplasias em suínos, no Estado do Paraná, encontrando 11 casos entre os anos de 1973 e 1988. Desses, os mais frequentes foram os melanomas, seguidos pelos fibromas e pelos carcinomas espino-celulares.

Não foram encontrados, na literatura consultada, relatos sobre a ocorrência de neoplasias em suínos, no Estado do Rio Grande do Sul.

DESCRIÇÃO DO CASO

Os primeiros casos de tumores foram identificados em dois animais de uma granja de porte industrial com 1.300 matrizes, situada na região das Missões, Rio Grande do Sul. Desses casos, o primeiro foi observado em um leitão de 25 dias de idade e o segundo em uma fêmea de terceira gestação. Os dois registros foram feitos com intervalo de três meses e os animais não possuem parentesco aparente.

Posteriormente, na mesma granja, dois novos casos foram registrados. O primeiro ocorreu oito meses após o último caso e envolveu uma fêmea de segunda cria; o segundo, em uma fêmea de quarta cria, apareceu nove meses depois.

Fragmentos dos tumores dos dois primeiros animais foram retirados para a realização de exame histopatológico. Os materiais foram fixados em solução de formalina a 10%, processados pelas técnicas rotineiras de inclusão em parafina, seccionados a cinco micrômetros, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e examinados ao microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Macroscopicamente, o primeiro tumor, presente no leitão, media em torno de 10cm de comprimento por 3,0 cm de largura e por 0,6 cm de altura, apresentava uma coloração vermelho-acastanhada, superfície irregular e rugosa e localizava-se entre a base da orelha esquerda e parte da face. O segundo situava-se acima da narina esquerda da porca e media cerca de 8,0 X 1,5 X 0,4 cm, exibia coloração rosada e sua superfície era rugosa e irregular.

Oa dois casos posteriores se apresentaram na região superior da cabeça, próximo às orelhas, com características semelhantes às observadas na da primeira porca.

Microscopicamente, as neoplasias exibiram características de papilomas, traduzidas por projeções de epiderme hiperplásica suportadas por delgados pedúnculos dérmicos; a maioria das células hiperplásicas pertenciam ao estrato espinhoso e exibiam degenera-

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisas Veterinária Desidério Finamor-CPVDF, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet., M.Sc. – Prof. Adjunto do Curso de Medicina Veterinária da ULBRA, Caixa Postal 124, 92420-280 Canoas – RS/BRASIL.

3. Méd. Vet., M.Sc. – Prof. Adjunto da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 95140-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

ção baloniforme. As alterações macroscópicas e os achados histopatológicos observados são semelhantes à descrição realizada por YAGER e SCOTT (1993).

A ocorrência de papilomas em suínos é infrequente. HERES (1978) diagnosticou, histologicamente, oito casos de papilomas entre 27 tumores de suínos na Romênia.

Conforme YAGER e SCOTT (1993), os papilomas cutâneos são neoplasias benignas que apresentam etiologia e patogenia complexas. Para esses autores, os papilomavírus estão associados com a produção de papilomas em todas as espécies, exceto nos gatos. Entretanto, na literatura consultada, não se encontrou referência específica à etiologia dessas neoplasias em suínos. PARISH (1961) refere-se à uma forma específica de papiloma genital em suínos, semelhante ao condiloma acuminatum humano. Deste, foi isolado um agente filtrável através de uma membrana de 300 micrômetros, capaz de reproduzir a doença quando inoculado experimentalmente. No presente caso, não foram observadas lesões na área genital em nenhum dos animais da granja.

CONCLUSÕES

Papilomatose cutânea foi diagnosticada em quatro suínos no RGS. Os achados macroscópicos e microscó-

picos foram característicos da doença, a qual ocorreu na região da cabeça tanto em animais jovens como em adultos.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- CIRIO, S.M.; DINIZ, J.M.; LEITE, L.C. Incidência de neoplasias em suínos. In: _____. **NOTICIÁRIO TÉCNICO-CIENTÍFICO ABRAVES**, Curitiba, n. 5, p. 7-9, 1991.
- COTCHIN, E. Tumors of swine. **Bull. World Health Org.**, v. 26, n. 5, p. 633-648, 1962.
- HERES, S. Rare cases met in the medical practice in pigs. In: **IPVS Congress**, 5., 15 out., Zagreb. **Proceedings...** 1978, p.47.
- LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of The Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258 p.
- MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 2. ed. Berkeley: University of California Press, 1978. 465 p.
- PARISH, W.E. A transmissible genital papilloma of the pig resembling condyloma acuminatum of man. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 81, p.331-345, 1961.
- YAGER, J.A.; SCOTT, D.W. The skin and appendages. In: JUBB, K.F.V.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 531-738.

ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM ANIMAIS DA RAÇA LEITEIRA IMPORTADOS DO URUGUAI

ALEXANDRE de CARVALHO BRAGA¹, JÚLIO CÉSAR de ALMEIDA ROSA², LILIANE GUIMARÃES OLIVEIRA²,
PAULO ESTANISLAO RECKZIEGEL¹, JOÃO CARLOS FREITAS TEIXEIRA³, CLÁUDIA SANTOS LISBOA⁴

RESUMO – O Vírus da Leucose Bovina (VLB) é o agente etiológico de infecção persistente em bovinos causando perdas econômicas para a pecuária. Estima-se que na pecuária leiteira as perdas podem atingir 10% da produção de leite. Bovinos infectados pelo VLB são fontes de disseminação da enfermidade no rebanho. A identificação de animais soropositivos é fundamental para programas de controle e erradicação desta doença. O objetivo do trabalho foi verificar a presença de anticorpos contra o VLB em bovinos da raça leiteira importados do Uruguai para propriedades do Rio Grande do Sul. Foram examinadas 692 amostras de soro bovino, utilizando-se a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), sendo de 15,60% o índice de positividade. Este resultado mostra que apesar do alerta feito pelos pesquisadores, as importações continuam desconsiderando, no caso da Leucose Bovina, o aspecto sanitário dos animais.

Palavras-chave: anticorpo, vírus, leucose, bovino, gado leiteiro.

PRESENCE OF ANTIBODIES AGAINST BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN DAIRY CATTLE IMPORTED FROM URUGUAY

ABSTRACT – The Bovine Leukemia Virus (BLV) is the infectious agent responsible for a persistent infection in cattle which causes severe losses to the livestock industry. The losses in dairy herds are estimated in 10% of milk yield. Cattle infected with BLV serve as a source of virus transmission to susceptible cattle. For control or eradication programs it is important to identify the seropositive animals. The objective of this study was to evaluate the presence of antibodies against BLV in dairy cattle imported from Uruguay to farms of the Rio Grande do Sul state. A total of 692 serum samples were tested through the agar-gel immunodiffusion test. The number of seropositive cattle was 15.60%. The results showed in despite of the warning given by some researchers, many animals are often imported without care regarding to the bovine leukosis status.

Key words: antibodies, bovine leukemia virus, dairy cattle.

INTRODUÇÃO

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) é o agente etiológico responsável por duas apresentações distintas, em bovinos: a Linfocitose Permanente (LP) e a forma multicêntrica enzoótica de Linfossarcoma de animais adultos.

O VLB possui no seu genoma um RNA de fita simples e está classificado na família Retroviridae (subfamília: Oncovirinae) possuindo formato esférico, partículas envelopadas e seu tamanho é de 80-120 nm. O vírus pode ser isolado de linfócitos de sangue periférico de bovino infectado (ANDREWES, 1989) e propagado em células renais de feto ovino (FLK).

A infecção pelo VLB está distribuída mundialmente e a sua presença na América do Sul, possivelmente ocorreu com a importação de bovinos infectados oriundos dos Estados Unidos e da Europa. O primeiro relato da doença em bovinos foi em 1871 em uma literatura

médica alemã (JOHNSON e KANEENE, 1993). No Brasil, o linfossarcoma bovino foi descrito pela primeira vez em 1959 (MERKT et al., 1959). Neste mesmo ano, também foram relatados casos de animais infectados, importados da Suécia para o Brasil (SANTOS et al., 1959).

A prevalência da infecção varia muito entre os diversos países, bem como entre as regiões de um mesmo país. Em áreas mais quentes geralmente a prevalência é maior, sendo também mais frequente em rebanhos de leite (JOHNSON e KANEENE, 1993). No Brasil, trabalhos realizados mostram que os índices de animais soropositivos também variam entre as regiões. No Rio Grande do Sul, alguns índices de soropositividade verificados foram: 32,6% (GOMES et al., 1985); 20,71% na região central do Estado (FLORES et al., 1990), prevalência média de 12% no rebanho leiteiro (MORAES et al., 1996) e 4% das amostras de soro, recebidas para diagnóstico de rotina, pela Equipe de

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor

3. Biol. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor

4. Méd. Vet., M.Sc. – Elegê Alimentos

Recebido para publicação em 25/11/1997.

Virologia do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (BRAGA, 1997). Outros estudos epidemiológicos mostraram índices de soropositividade, no estado de São Paulo, de 36,6% (ALENCAR FILHO et al., 1979) e de 49,2% em bovinos da raça Jersey (JÚNIOR et al., 1995). No Paraná, foi obtido um índice de 20,7% no rebanho leiteiro (KANTEK et al., 1983) e 26,69% no estado de Minas Gerais (MODENA et al., 1984). No Rio de Janeiro, foi verificado em 12 rebanhos leiteiros uma frequência média de 49,25% de positividade (ROMERO et al., 1981).

Quanto aos índices de soropositividade em animais importados os dados de alguns trabalhos são: 70,86% em bovinos oriundos do Canadá em 1981 e 12,5% em bovinos do Canadá e Estados Unidos (MODENA et al., 1983). Em animais de raça leiteira importados do Uruguai os índices foram de 18,3% em 1982 (NAVARRO et al., 1982) e 12,1% (sendo 21,63% somente em bovinos da raça Holandesa) em 1992 (FLORES et al., 1992).

O Linfossarcoma causado pelo VLB é a forma neoplásica maligna mais comum em bovinos (FERRER, 1979). Neste tipo de enfermidade os linfócitos B malignos infiltram-se nos tecidos linfóides do corpo, principalmente nos linfonodos periféricos e baço, produzindo um linfossarcoma multicêntrico. Os sinais clínicos são variáveis, dependendo da localização dos tumores no organismo animal. A LP ocorre independente da forma de linfossarcoma multicêntrico, sendo de caráter benigno e havendo uma proliferação dos linfócitos B em animais infectados pelo VLB (ANDREWES, 1989). Em torno de 33% dos animais infectados desenvolvem a LP (JOHNSON e KANEENE, 1993) e a ocorrência de linfossarcoma raramente ultrapassa o índice de 5% (FERRER, 1979). Estes dados fortalecem a hipótese de que pode existir uma predisposição genética dos animais para desenvolver as formas clínicas da doença.

A transmissão do VLB ocorre principalmente de forma horizontal e a forma vertical é considerada de baixa frequência (04-10%). Uma das principais formas de transmissão horizontal é através do uso de equipamentos ou materiais contaminados com sangue infectado, tais como, agulhas hipodérmicas e materiais cirúrgicos lavados e esterilizados de forma inadequada (ROMERO et al., 1984). O uso de vacinas para Piroplasmose, preparadas em animais infectados com o VLB, também são fontes de infecção. Outra forma de contaminação é através de insetos (Tabanídeos). A transmissão da enfermidade utilizando-se material proveniente de carrapatos que estavam alimentando-se em bovinos soropositivos foi observada (ROMERO et al., 1984), porém a forma natural da transmissão não foi comprovada (JOHNSON e KANEENE, 1993).

Os exames laboratoriais mais utilizados para o diagnóstico da infecção pelo VLB são: imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ELISA. Estas provas sorológicas

são fundamentais para avaliações epidemiológicas, pois elas são mais sensíveis do que a constatação de tumores ou de um quadro de linfocitose na detecção da infecção pelo VLB (JOHNSON e KANEENE, 1993).

A identificação dos animais soropositivos em um rebanho é de fundamental importância em programas de controle e erradicação do VLB, pois os animais infectados permanecem portadores por toda a sua vida, sendo fontes de infecção para o plantel (FERRER, 1979). A atitude a ser tomada, para o controle da doença deverá estar relacionada com o índice de prevalência de animais soropositivos no rebanho. Quando os índices de prevalência da infecção pelo VLB forem baixos deverá ser realizado o descarte dos bovinos soropositivos e corrigir o manejo evitando as formas de disseminação da doença. Novos testes sorológicos deverão ser realizados para monitorar o plantel, assim como todos os animais a serem incorporados no plantel deverão ser soronegativos. Nos rebanhos cuja prevalência de animais soropositivos for alta, causando problemas econômicos devido ao elevado número de animais a serem descartados, uma possível solução poderá ser a separação dos animais soronegativos dos demais e fazer um manejo duplo na propriedade (JOHNSON e KANEENE, 1993).

O objetivo do trabalho foi determinar a presença de animais com anticorpos contra o VLB importados do Uruguai para propriedades do Rio Grande do Sul, analisando a situação, após os vários alertas de pesquisadores com relação aos cuidados a serem tomados com a Leucose Bovina e a importação de animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

As provas foram executadas no laboratório da Equipe de Virologia do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF) – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) – Secretaria da Ciência e Tecnologia – RS/Brasil.

Animais

Foram analisadas 692 amostras de soro bovino da raça Holandês PPC com idade variando dos 2,5 aos 3,0 anos. Estes animais eram provenientes de 15 propriedades localizadas em três regiões do Uruguai (Trinta y Tres; Lascano e Florida).

Prova Sorológica

As amostras de soro foram submetidas à prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), de acordo com a técnica descrita por FLORES et al. (1992) e utilizando-se o antígeno glicoprotéico – gp 51, produzido pela Equipe de Virologia do CPVDF (MILLER e VANDER MAATEN, 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 692 amostras submetidas ao teste de IDGA foi detectada a presença de anticorpos contra o VLB em 108 amostras (15,60%). Somente as amostras de oito

propriedades foram 100% negativas. Porém deve ser realçado que destas propriedades foram coletadas um número muito pequeno de amostras (4,47% das amostras). Os resultados por propriedade estão expressos abaixo, na Tabela 1.

TABELA 1 – Distribuição dos animais por propriedade e resultado das amostras por IDGA para a presença de anticorpos contra o VLB

PROPRIEDADE	NÚMERO (%) (% SOBRE O TOTAL DE AMOSTRAS)	IDGA	
		POSITIVOS (%)	NEGATIVOS (%)
A	021 (3,03)	04 (19,04)	017 (80,95)
B	120 (17,34)	16 (13,33)	104 (86,66)
C	015 (2,16)	04 (26,66)	011 (73,33)
D	015 (2,16)	08 (53,33)	007 (46,66)
E	005 (0,72)	–	005 (100)
F	004 (0,57)	–	004 (100)
G	035 (5,05)	18 (51,42)	017 (48,57)
H	005 (0,72)	–	005 (100)
I	037 (5,34)	03 (8,10)	034 (91,89)
J	003 (0,43)	–	003 (100)
N	005 (0,72)	–	005 (100)
R	418 (60,40)	55 (13,15)	363 (86,84)
T	003 (0,43)	–	003 (100)
V	003 (0,43)	–	003 (100)
W	003 (0,43)	–	003 (100)
TOTAL (%)	692 (100)	108 (15,60)	584 (84,39)

O atual trabalho vem confirmar os anteriores já mencionados na introdução e mostrar que, no caso da Leucose Bovina muito pouco tem sido feito pelas autoridades sanitárias com relação a importação de animais. A entrada de animais infectados com o VLB em um rebanho será responsável por introduzir ou aumentar os índices de prevalência da enfermidade dificultando o processo de controle da doença. Por esta razão, é fundamental adquirir somente animais soronegativos ou oriundos de propriedades comprovadamente livres do VLB. A análise sorológica para a aquisição de animais deve ser realizada no mínimo duas vezes com intervalo de dois meses, pois títulos baixos de anticorpos, não detectados na primeira prova de IDGA poderão ser evidenciados em uma segunda análise (VAN DER MAATEN e MILLER, 1979). Caso fosse realizada uma segunda amostragem com os animais testados neste trabalho o índice de positividade provavelmente seria maior.

CONCLUSÕES

Apesar das advertências de diversos técnicos o Brasil não possui um programa sanitário oficial com relação a Leucose Bovina. A ausência deste programa e do sistema de reciprocidade entre as nações que compõem o Mercosul impede que as autoridades brasileiras possam exigir restrições na importação de animais oriundos destes países. O estado do Rio Grande do Sul está iniciando um programa de melhoria genética do gado Holandês onde pretende importar 3.000 matrizes do Uruguai. Como o governo não pode exigir o exame sorológico para a detecção da infecção pelo VLB cabe aos produtores pedir a elaboração deste exame, pois eles irão arcar com os custos da aquisição dos animais, devendo portanto exercer os seus direitos de adquirir bovinos com excelente padrão zootécnico sem descuidar do aspecto sanitário. A compra deverá ser feita somente de animais soronegativos, de preferência após a realização de

dois testes sorológicos com intervalo mínimo de 30 dias (JOHNSON e KANEENE, 1993) ou oriundos de propriedades indene.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALENCAR FILHO, R.A.; MAZANTI, M.T.; SAAD, A.A.; POHL, R. Levantamento da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (LLC) dos bovinos no estado de São Paulo. *Biológico*, São Paulo, v. 45, n.3, p. 47-54, 1979.
- ANDREWES, C. Retroviridae. In: ANDREWES, C. *Viruses of vertebrates*. 5. ed. London: Baillière Tindall, 1989. Cap. 12, p. 166-190.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Jersey, criados no estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 93-99, 1995.
- BRAGA, A. C. Situação do rebanho gaúcho de aves, suínos e ruminantes no cenário nacional e seu estado sanitário. Porto Alegre: FEPAGRO, 1997. 18 p. (Circular Técnica, 13).
- FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 175, n. 12, p. 128-136, 1979.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; REBELATTO, M. C. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 10, n. 58, p. 25-29, 1990.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; OLIVEIRA, C.; KREUTZ, L. C. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soro de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 12, n. 68, p. 05-08, 1992.
- GOMES, M.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J. C. T.; FERREIRO, L. Detecção de anticorpos séricos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v. 13, p. 15-22, 1985.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. Part II. Risk factors of transmission. Part III. Zoonotic potential, molecular epidemiology, and an animal model. Part IV. Economic impact and control measures. In: *Infectious Disease. The Compendium Collection*, Trenton: Veterinary Learning System, 1993. p. 122-157.
- KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 125-129, 1983.
- MERKT, H.; GIUDICE, C. O.; MULLER, J. A. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio Grande do Sul. *Revista da Escola de Agronomia e Veterinária do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, v. 2, p. 7-19, 1959.
- MODENA, C. M.; ABREU, V. L.V.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C.; AZEVEDO, N. A.; REHFELD, O. A. M. Ocorrência de infecção pelo vírus de leucose enzoótica bovina em animais importados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 565-573, 1983.
- MODENA, C. M.; SILVA, J. A.; GOUVEIA, A. M. G.; VIANA F. C.; AZEVEDO, N. A.; REHFELD, O. A. M. Leucose enzoótica bovina: I- Prevalência em rebanhos de alta linhagem no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 36, n.1, p. 39-45, 1984.
- MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *European Journal of Cancer*, v. 13, p. 1369-1375, 1977.
- MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; OLIVEIRA, J. C. D.; REBELATTO, M. C.; ZANINI, M.; RABUSKE, M.; HÜBNER, S. O.; PEREIRA, N. M. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996.
- NAVARRO, C. E. K.; KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do Uruguai. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p.125-126, 1982.
- ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v.13, p.107-111, 1981.
- ROMERO, C. H.; ABARACON D., ; ROWE, C. A.; SILVA, A. G. Bovine leukosis virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks. *Veterinary Record*, London, v.115, n.17, p. 440-441, 1984.
- SANTOS, J. A.; PINHEIRO, P. V.; SILVA, L. J. Linfossarcoma com lesões da língua e das câmaras cardíacas em bovinos. *Anais da Escola Fluminense de Medicina Veterinária*, Niterói, v. 2, p. 1-8, 1959.
- VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M. Appraisal of control measures for bovine leukosis. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.175, n.12, p.1287-1290, 1979.

**PERSISTÊNCIA DE REAÇÕES SOROLÓGICAS EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) VACINADAS COM
Brucella abortus AMOSTRA 19**

FERNANDO PADILLA POESTER¹, PAULO ESTANISLÃO RECKZIEGEL¹

RESUMO – Foi estudada a evolução dos títulos sorológicos em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dose padrão da amostra 19 de *Brucella abortus*. Após coletas mensais de sangue por um período de dez meses de observação e usando-se três provas sorológicas, concluiu-se que as curvas de anticorpos nesta espécie foram similares às produzidas na espécie bovina. Os animais permaneceram reagentes até 270 dias após a vacinação e aos 300 dias todos foram negativos.

Palavras-chave: brucelose, bubalino, vacina B19, anticorpo.

**PERSISTENT SEROLOGICAL REACTIONS IN BUFFALO HEIFERS (*Bubalus bubalis*) VACCINATED WITH
Brucella abortus STRAIN 19**

ABSTRACT – The evolution of serological titers of buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) vaccinated with standard dose of *Brucella abortus* strain 19 was studied. Blood samples collected monthly for a period of ten months tested by three serological tests showed that the antibody curves produced in this species were similar to those of bovines. The animals reacted for 270 days after vaccination and at 300 days all were negatives.

Key words: brucellosis, buffalo, strain 19, antibody.

INTRODUÇÃO

A vacina contra a brucelose amostra 19 tem sido usada ao longo de várias décadas como o imunógeno preferencial na prevenção da brucelose dos bovinos (MATYAS e FUJIKURA, 1983). Apesar da boa imunidade conferida, esta vacina apresenta como principal inconveniente a persistência de anticorpos vacinais que complicam a interpretação do diagnóstico sorológico (ACHA e SZYFRES, 1989).

Apesar dos poucos trabalhos publicados, alguns inquéritos sorológicos indicam que a brucelose está disseminada em búfalos da espécie *Bubalus bubalis* no Brasil (SANTA ROSA et al., 1961; COSTA et al., 1973; SANDOVAL et al., 1979). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a brucelose nos búfalos segue um curso similar ao observado nos bovinos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Como consequência, o controle e a prevenção da enfermidade nos bubalinos, a exemplo do que ocorre nos bovinos, deverá basear-se entre outras medidas, no emprego da vacinação com a amostra 19 de *Brucella abortus*.

As reações sorológicas produzidas por *B. abortus* amostra 19 na espécie bovina têm sido bastante documentadas e mostram que a persistência dos títulos sorológicos pós-vacinais está diretamente relacionada com a idade de vacinação (KING e FRANK, 1961; RODRIGUES e GIORGI, 1973; FERNANDES e

MOOJEN, 1974; NICOLETTI, 1990). Em raças zebuínas vacinadas com a amostra 19, as curvas de anticorpos pós-vacinais são semelhantes às observadas nos bovinos (ORNELAS-SANTOS et al., 1975). Em fêmeas jovens da espécie *Bubalus bubalis* vacinadas com dose padrão de *B. abortus* amostra 19, DOMINGUES et al. (1992) concluíram que a queda dos títulos sorológicos deu-se num período relativamente maior do que em bovinos.

O presente trabalho teve por objetivo o acompanhamento das curvas sorológicas em fêmeas bubalinas vacinadas com dose padrão da amostra 19 por um período de até 300 dias após a vacinação.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezenove fêmeas da espécie *Bubalus bubalis* com idade compreendida entre 4 e 10 meses foram vacinadas por via subcutânea com dose padrão (6×10^{10} bactérias) da amostra 19 de *Brucella abortus*. Os animais foram mantidos em sistema de regime extensivo.

Antes da aplicação da vacina e mensalmente por um período de dez meses, foram colhidas amostras de sangue por punção da veia jugular.

Após a obtenção do soro, as amostras foram submetidas às provas sorológicas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), prova lenta em tubos (SAT) e prova do mercaptotanol (ME), segundo ALTON et al. (1988).

¹ Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL. Recebido para publicação em 25/11/1997.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de soro de todos os animais, antes da aplicação da vacina, foram negativas a todas as provas sorológicas. Os resultados obtidos nas provas sorológicas empregadas ao longo do experimento estão expostos na Figura 1 e na Tabela 1.

Nas curvas sorológicas delineadas na Figura 1 observa-se que a prova do ME apresentou uma queda no nível de anticorpos bastante acentuada a partir dos 60 dias após a vacinação. À semelhança do que ocorre nos bovinos, o tratamento das amostras de soro com ME

parece ter eliminado as reações sorológicas produzidas por anticorpos da classe IgM (ANDERSON, 1964). Por outro lado, a prova do AAT foi a que se manteve positiva por mais tempo. Em função da sua alta sensibilidade, a prova do AAT tem sido empregada com sucesso em bovinos como teste de descarte ("screening") havendo a necessidade de confirmação dos soros positivos em outras provas sorológicas (MACMILLAN, 1990). No presente experimento, esta prova demonstrou ser mais sensível que as demais, o que poderia justificar seu uso como prova de descarte também para bubalinos.

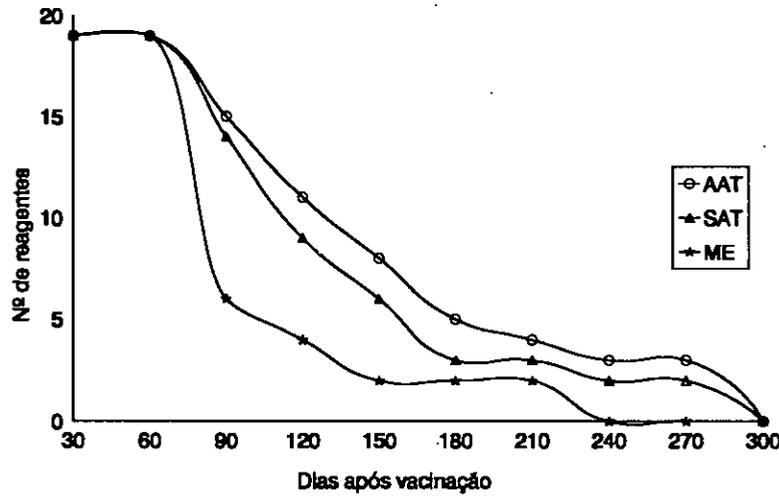


FIGURA 1 – Distribuição da frequência de búfalas vacinadas com B19 em diferentes provas sorológicas

NICOLETTI (1992), comparando diversas provas sorológicas em bubalinos, concluiu que a prova do AAT apresentou boa sensibilidade e que a prova de aglutinação em tubos apresentou a menor sensibilidade para esta espécie.

Pela análise da Tabela 1, observa-se que até 60 dias após a vacinação, 100% dos animais ainda apresentavam títulos sorológicos classificados entre suspeitos e positivos. A partir daí, os títulos foram decrescendo progressivamente, sendo os animais negativos a todas as provas aos 300 dias de vacinados.

TABELA 1 – Flutuação da resposta sorológica em búfalas vacinadas com B19 em três provas diagnósticas

	Dias após vacinação																			
	30		60		90		120		150		180		210		240		270		300	
	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%
AAT	19/0	100	19/0	100	15/4	80	11/8	58	8/11	42	5/14	26	4/15	21	3/16	16	3/16	16	0/19	0
	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%
	Neg	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	5 (26)	6 (31)	9 (47)	9 (47)	10 (53)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	9 (47)	10 (53)
SAT	1/25	0 (0)	0 (0)	4 (21)	8 (42)	11 (58)	11 (58)	10 (53)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	8 (42)	9 (47)	9 (47)
(n=19)	1/50	0 (0)	2 (10)	7 (37)	5 (26)	5 (26)	2 (10)	3 (16)	2 (10)	3 (16)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	0 (0)	0 (0)
	1/100	2 (10)	13 (68)	4 (21)	4 (21)	3 (16)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1/200	10 (53)	4 (21)	4 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1/400	7 (37)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ME	Neg	0 (0)	0 (0)	2 (10)	12 (63)	15 (79)	15 (79)	17 (90)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	18 (95)	19 (100)	19 (100)
(n=19)	1/25	0 (0)	0 (0)	11 (58)	3 (16)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	1 (5)	0 (0)
	1/50	5 (26)	11 (58)	4 (21)	3 (16)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	0 (0)	0 (0)
	1/100	6 (31)	4 (21)	2 (10)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1/200	6 (31)	4 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1/400	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Em função do tipo de imunoglobulina detectado, a prova do ME apresentou um declínio mais acentuado no número de reagentes comparado ao da prova lenta e aos 120 dias apenas um animal apresentou reação 1/100, o que está de acordo com os resultados encontrados para bovinos por FERNANDES e MOOJEN (1974), os quais verificaram que os títulos no ME permaneceram em baixos níveis até 105 dias após a vacinação.

No presente estudo, o período para que todos os animais voltassem a ser negativos sorologicamente foi de dez meses e pode ser considerado um tanto longo. Entretanto esta demora pode estar relacionada ao fato de alguns animais terem sido vacinados com idade entre 9-10 meses o que está de acordo com os resultados encontrados para bovinos por RODRIGUES e GIORGI (1973) e ORNELAS-SANTOS et al. (1975), que concluíram ser este período diretamente relacionado com a idade dos animais no momento da vacinação.

Os resultados encontrados, no presente estudo, são similares aos encontrados por DOMINGUES et al. (1992) onde aqueles autores encontraram que bubalinos vacinados entre 3 e 8 meses idade com dose padrão mantiveram-se com títulos detectáveis até 240 dias após a vacinação. Apesar disto, os resultados não permitem afirmar que os bubalinos apresentem queda nos títulos sorológicos num período maior do que os bovinos como concluem DOMINGUES et al. (1992), tendo em vista que no presente trabalho, alguns animais foram vacinados com dez meses.

CONCLUSÕES

Fêmeas bubalinas vacinadas com dose padrão da amostra 19 respondem com curvas de anticorpos semelhantes às apresentadas por fêmeas bovinas quando vacinadas na mesma idade. Fêmeas vacinadas entre 4 e 10 meses, permanecem reagentes por um período de até 10 meses depois da vacinação.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed., Washington, Organización Panamericana de la Salud, 1989. 989 p. (Publicación científica, 503).
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: INRA, 1988. 190 p.
- ANDERSON, R.K. *Brucella*-agglutinating antibodies; relation of Mercaptoethanol stability to complement fixation. *Science*, Washington, v.143, p. 334, 1964.

- COSTA, E.O.; CURY, R.; ROCHA, V.F. Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos *Bubalus bubalis* (Linnaeus 1758) no Estado de Goiás: inquérito sorológico. *O Biológico*, São Paulo, v. 6, p.162-164, 1973.
- DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; FESSEL, Y.M.N. Pesquisa de aglutininas anti-brucella sp em soros de bezerras bubalinas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dose padrão ou reduzida da amostra B19. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 491-500, 1992.
- FERNANDES, J.C.T.; MOOJEN, V. Título aglutinante em teneiras de três a sete meses vacinadas com *Brucella* 19 (B19). *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Pôrto Alegre*, v. 2, n.1, p.11-15, 1974.
- KING, N.B.; FRANK, N.A. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Illinois, v. 91, p.100, 1961.
- MACMILLAN, A. Conventional serological tests. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, R. *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. cap. 8, p.153-197.
- MATYAS, Z.; FUJIKURA, T. Brucellosis as a world problem. *Developments in Biological Standardization*, Basel, v. 56, p.3-20, 1983.
- NICOLETTI, P. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, R. *Vaccination*., Boca Raton: CRC Press, 1990. cap.11, p.283-299.
- NICOLETTI, P. An evaluation of serological tests used to diagnose brucellosis in bufaloes (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 24, n.1, p. 40-44, 1992.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Comite Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis*, Ginebra, 1986. Sexto informe, 149 p. (Informes Técnicos, n.740)
- ORNELAS-SANTOS, P.P.; ARAÚJO, R.F.; REIS, R.; MOREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, J.B.; VIANA, F.C.; BARROS, D.G.; JARDIM, O.M. Brucelose bovina. I. Persistência da aglutinação pos-vacinal em bezerras de raças zebuínas vacinadas com amostra 19. *Arquivos da Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte*, v. 27, n. 3, p. 363-377, 1975.
- RODRIGUES, F.M.; GIORGI, W. Observação dos títulos aglutinantes em soros de bovinos de diferentes idades vacinados com a amostra 19. *O Biológico*, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 36-39, 1973.
- SANDOVAL, L.A.; ARRUDA, N.M.; TERUYA, J.M.; GIORGI, W.; AMARAL, L.B.S.; MAZANTI, M.T. Pesquisa em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo. *O Biológico*, São Paulo, v. 45, n.11-12, p. 209-212, 1979.
- SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TROISE, C. Títulos aglutinantes para *Brucella* em búfalos do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 28, p. 35-39, 1961.

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA NA RESISTÊNCIA NATURAL À VERMINOSE EM OVINOS DA RAÇA CORRIEDALE

CLAUDIO CHIMINAZZO¹, LUIZ ALBERTO O. RIBEIRO², TANIA de A. WEIMER³

RESUMO -A resistência à verminose num rebanho ovino da raça Corriedale foi estudada em relação aos diferentes tipos de hemoglobina (Hb). Foram utilizados 239 borregas (24 com HbA, 103 com HbAB e 112 com HbB), expostas às mesmas condições de manejo e infecção natural. Amostras de fezes foram coletadas a cada 28 dias, em média, de dez/90 a nov/91 e a contagem de ovos por grama de fezes (O.P.G.) revelou que os ovinos com HbA apresentaram menor percentagem de animais positivos para o O.P.G. ($P < 0,05$) nos meses de dez/90, jun/91, out/91 e nov/91 em relação aos ovinos com HbB. Os ovinos com HbAB apresentaram menor percentagem de animais positivos para o O.P.G. ($P < 0,05$) nos meses de maio/91 e jun/91 em relação aos ovinos com HbB. Com relação as médias de O.P.G. observou-se que os ovinos com HbB foram também os que apresentaram os maiores valores ($P < 0,05$) nos meses de dez/90, maio/91, jun/91, out/91 e nov/91. Pelos resultados observados, os ovinos com HbB demonstraram a maior percentagem de animais positivos para o O.P.G., assim como as maiores médias de O.P.G. ao longo do experimento. Os resultados sugerem que ovinos HbB são os mais suscetíveis à verminose.

Palavras-chave: resistência, verminose, ovino, hemoglobina.

RELATIONSHIPS BETWEEN HEMOGLOBIN TYPES AND NATURAL RESISTENCE TO NEMATODE PARASITES IN CORRIEDALE SHEEP.

ABSTRACT- The resistance to nematode parasites in Corriedale sheep was studied to different types of hemoglobin (Hb). A group of 239 gimmers (24 with HbA, 103 with HbAB and 112 with HbB) were exposed to the same type of management and natural infection. Samples of feces were collected on average every 28 days of Dec/90 to Nov/91 and were used for nematode egg counts per gram (EPG). The study revealed that the sheep with HbA presented smaller percentage of positive animals for EPG ($P < 0.05$) in the months of Dec/90, Jun/91, Oct/91 and Nov/91 in relation to the sheep with HbB. The sheep with HbAB presented smaller percentage of positive animals for EPG ($P < 0.05$) in the months of May/91 and Jun/91 in relation to the sheep with HbB. The hemoglobin type B sheep showed the highest mean values of EPG ($P < 0.05$) in the months of Dec/90, May/91, Jun/91, Oct/91, and Nov/91. The results obtained in this study suggest that the sheep with HbB are the most susceptible to nematode parasites evaluated by fecal egg counts.

Key words: resistance, nematode parasites, sheep, hemoglobin.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura representa importante seguimento na pecuária do Rio Grande do Sul. O Estado que chegou a ter ao redor de 13 milhões de cabeças há poucos anos atrás, hoje amarga números que beiram não mais que 10 milhões de cabeças (RIBEIRO, 1997). A baixa no preço pago no mercado internacional pela lã levou ao desestímulo muitos criadores e o rebanho que era eminentemente laneiro começou a mostrar um direcionamento maior para produção de cordeiros, como forma de amenizar os problemas enfrentados com a rentabilidade do setor.

Alguns aspectos do sistema de criação ovina, tanto de carne como de lã, praticados no Rio Grande do Sul, têm assumido grande importância, entre eles o

manejo sanitário que inclui, principalmente, o controle da verminose. Os parasitos internos constituem provavelmente o maior problema sanitário com que se deparam os ovinocultores gaúchos. Seu controle tem sido baseado historicamente no uso de anti-helmínticos e na aplicação de algumas medidas de manejo pelos produtores. Na maioria da vezes, muitos produtos anti-helmínticos são comercializados e usados numa tentativa de controlar as parasitoses e diminuir os prejuízos inerentes à infecção, sem um enfoque estratégico. (ECHEVARRIA, 1996).

O surgimento de resistência em alguns parasitos às drogas já é uma realidade entre os criadores e evolui à medida que novos produtos surgem no mercado. O uso indiscriminado de drogas, além de oneroso, tem levado em nosso meio ao aparecimento de resistência,

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária DesidérioFinamor, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet., M.Sc. – Professor Assistente do Departamento de Medicina Animal da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

3. Farm. Bioq., Ph.D. – Professora Titular do Departamento de Genética da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. Recebido para publicação em 25/11/1997.

principalmente do *Haemonchus contortus* ao thiabendazole (SANTOS e FRANCO, 1967; SANTOS e GONÇALVES, 1968), ao levamisole (SANTIAGO e COSTA, 1979) e a ivermectina (ECHEVARIA e TRINDADE, 1989).

Em outros países, nos últimos anos, além do uso de anti-helmínticos, tem-se dado especial ênfase a métodos alternativos, que incluem a utilização de bovinos adultos e equínos para promover a "limpeza" dos campos, o manejo das pastagens e estudos sobre os mecanismos de resistência e biologia dos parasitos. Também existe a possibilidade de aperfeiçoar a resistência de ovelhas à verminose, através do desenvolvimento de rebanhos geneticamente resistentes (MACIEL et al., 1996). Um crescente número de investigações tem se concentrado na procura de um marcador genético associado à resistência.

As primeiras observações sobre a resistência à verminose em rebanhos ovinos foram feitas por STEWART et al. (1937). A esse trabalho seguiram-se as observações de WHITLOCK (1955; 1958), que fez os primeiros relatos da existência de uma resistência herdável para os trichostrongilídeos, demonstrando que é possível, pela seleção do rebanho, criar populações de ovinos geneticamente resistentes ou suscetíveis para os mesmos. A resistência natural do hospedeiro a parasitos parece envolver ações de resposta antagônica do hospedeiro contra o desenvolvimento e presença continuada do parasito (RIFFKIN e DOBSON, 1979). Ela é definida segundo a competência imunológica do hospedeiro, e pode ser manifestada por deficiência no estabelecimento do parasito, inibição do desenvolvimento dos estágios larvários do parasito, redução da fecundidade de adultos e eliminação de infecções existentes.

A resistência às infecções parasitárias são expressas usando-se uma ou a combinação das seguintes características: número de parasitos adultos recuperados de ovinos abatidos, contagem de ovos por grama de fezes (O.P.G.) ou interpretação do hematócrito.

Evidências para o controle genético a partir destas características surgiram da comparação de diferentes rebanhos ovinos e de estimativas estatísticas da herdabilidade para resistência dentro dos grupos estudados (GRAY, 1987). Os valores de hematócrito provaram ser de pouco valor na seleção de animais resistentes à verminose (KASSAI et al., 1990).

É possível afirmar que existe um forte consenso para o fato de que o exame de O.P.G. represente um bom indicador do grau de infecção parasitária dos ovinos. Num rebanho conhecido, onde os animais estejam perfeitamente identificados e mantidos sob as mesmas condições de manejo considera-se o emprego do O.P.G. como o melhor meio para estimar o grau de susceptibilidade ou resistência a infecções parasitárias em ovinos

(LE JAMBRE, 1978). Na opinião de PRESTON e ALLONBY (1978; 1979), os exames post-mortem de ovinos confirmam as contagens de O.P.G., isto é, são uma verdadeira reflexão do estabelecimento de parasitos adultos em ovinos.

ROBERTS e SWAN (1981; 1982) e KASSAI et al. (1990) consideram que o uso da contagem de ovos por grama de fezes poderia servir como um critério de seleção em programas de profilaxia de helmintose gastrointestinal em rebanhos ovinos. Os autores concluem que seus trabalhos sustentam o conceito do controle interno de parasitos baseado neste monitoramento.

Alguns trabalhos relacionando os tipos de hemoglobina e a resistência a helmintos gastrintestinais foram descritos, sugerindo que uma inter-relação entre os tipos de hemoglobina e a susceptibilidade a *Haemonchus contortus* poderia existir. EVANS et al. (1963) correlacionaram a contagem de ovos por grama de fezes (O.P.G.) e o número de parasitos adultos em exames post-mortem com a hemoglobina de ovinos. JILEK e BRADLEY (1969) analisaram rebanhos ovinos e diferentes níveis de resistência, estabelecendo uma correlação altamente significativa com os níveis de hemoglobina e hematócrito. As ovelhas com HbA foram mais resistentes às infecções por *Haemonchus contortus*. A demonstração de que ovelhas com HbA revelavam fenômeno de autocura maior frequência e maior eficácia do que aquelas com HbAB e HbB foi feita por ALLONBY e URQUHART (1976).

O significado prático dessas observações sugere que novos empreendimentos no manejo de ovinos em áreas onde *Haemonchus contortus* é endêmico deveriam incorporar estudos sobre a performance dos três tipos de hemoglobina. A hipótese do gene da hemoglobina estar ligado ao gene da resistência parece ser mais realista (ZABALZA, 1992). Ainda que específicos genes envolvidos na resistência para hemonocose não tenham sido identificados, os trabalhos publicados indicam correlação entre resistência e os genes para hemoglobina (TEMPLETOM, 1988). O gene que controla a resistência poderia ser o da hemoglobina ou então estar intimamente ligado a ela.

Não existe para os ovinocultores um futuro promissor do ponto de vista unicamente químico para o controle da verminose em seus rebanhos. Revigora-se, desta forma, a necessidade de uma pesquisa contínua sobre o uso eficaz de anti-helmínticos associados a outras medidas para reduzir a dependência do controle químico dos parasitos. Entre elas, podemos citar o controle biológico, o desenvolvimento de vacinas eficientes contra os principais parasitos e também a seleção de ovinos resistentes à verminose. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a correlação dos tipos de hemoglobina com a resistência à verminose em ovinos do Rio Grande do Sul, mantidos em criação extensiva.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Eletroforese do Departamento de Genética da UFRGS e no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Utilizaram-se 239 borregas de dois dentes da raça Corriedale, oriundas de uma propriedade localizada no município de Dom Pedrito. Todos animais foram identificados com brincos plásticos na orelha esquerda e tatuagem na orelha direita. O grupo experimental assim constituído e identificado, foi mantido em potreiro separado do rebanho geral, obedecendo o mesmo manejo nutricional e reprodutivo dos ovinos da propriedade.

Amostras de sangue dos animais foram coletadas mediante punção venosa da veia jugular com agulhas 40x9, usando tubos de Vacutainer de 5 ml, contendo EDTA como anticoagulante. No laboratório, as amostras de sangue foram centrifugadas (2.000 rpm - 5') para separar as hemácias do plasma. As hemácias sofreram três lavagens com solução salina (0,09%). A porção de eritrócitos resultante dessas lavagens foi adicionada solução de glicerol (40% de glicerol ; 60% de citrato trissódico a 5%) na proporção de 1:1 (WEIMER et al., 1981). As hemoglobinas foram tipadas por eletroforese horizontal em gel de amido e para revelação dos padrões de hemoglobina foi utilizado o corante amido black 10 B. Deste modo, foram formados os três grupos experimentais (ovinos com hemoglobina A, AB e B).

Amostras de fezes de todos animais foram coletadas a cada 28 dias, em média, diretamente da ampola retal, condicionadas em sacos plásticos (10x15 cm) previamente identificados e mantidas em baixas temperaturas até o processamento. A coleta de setembro/91 não pode ser realizada devido às dificuldades de manejo durante a parição, principalmente em se tratando de borregas de primeira cria. A contagem de ovos de nematódeos gastrintestinais por grama de fezes (O.P.G.)

foi realizada conforme a técnica de GORDON e WHITLOCK (1939), sendo avaliadas as percentagens de ovinos positivos ao O.P.G. mensal nos três grupos experimentais, e também as médias de O.P.G. mensais para cada grupo. Os animais foram dosificados no início do experimento (dezembro/90) com closantel 10 mg/kg + albendazole 3,5 mg/kg, antes da parição (julho/91) com tetramizole 10 mg/kg e na época da assinalação dos cordeiros (novembro/91) com closantel 10 mg/kg + albendazole 3,5mg/kg.

Para a Análise Estatística utilizou-se o Teste do Qui-quadrado para comparar as percentagens de animais positivos ao O.P.G., nos grupos experimentais entre si, durante as coletas. As médias de O.P.G. de cada grupo de hemoglobina foram transformadas para Log x + 1, conforme KASSAI et al. (1990) e submetidas à Análise de Variância. As diferenças significativas encontradas foram analisadas pelo Teste Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição dos tipos de hemoglobina nas 239 borregas utilizadas e a frequência gênica obtida são apresentadas na Tabela 1 e Figura 1, respectivamente. Os dados indicam que a frequência gênica para o alelo **Hb B** foi de 0,68, aproximadamente o dobro do valor encontrado para o alelo **Hb A**, que foi de 0,32. O tipo de hemoglobina mais encontrado foi o **B** com 46,86%, seguido do tipo **AB** com 43,10% e, finalmente o tipo **A** com 10,04%. Resultados similares aos apresentados na Tabela 1 foram encontrados no Japão, por AKAGI et al. (1970) e em Santa Maria por FAN et al. (1981) e por MOREIRA et al. (1982) ao pesquisarem fenótipos de hemoglobina em ovinos da raça Corriedale.

WEIMER et al. (1984) trabalhando com ovinos Corriedale da EMBRAPA/Bagé, registraram em fêmeas uma frequência gênica para o alelo **Hb A** de 0,46 e para o fenótipo de **HbA** de 19 %, bem maior que as encontradas neste experimento.

TABELA 1 - Distribuição fenotípica da hemoglobina

TIPO DE HEMOGLOBINA	A	AB	B	TOTAL
Nº DE ANIMAIS	24	103	112	239
%	10,04	43,10	46,86	100

Os resultados encontrados confirmam que os alelos para hemoglobina A e B apresentam frequências gênicas com grande variabilidade em diferentes reba-

nhos ovinos dentro da mesma raça, podendo representar, além de uma adaptação as condições do meio, influência da seleção para caracteres produtivos.

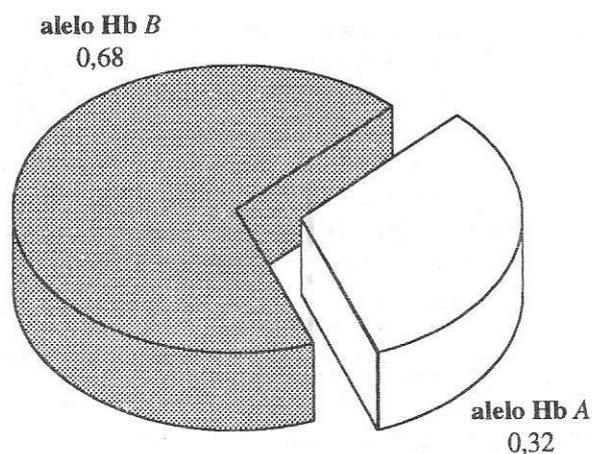


FIGURA 1 – Freqüência Gênica para os alelos de hemoglobina em ovinos da raça Corriedale (Dom Pedrito/RS)

A contagem de ovos por grama de fezes (O.P.G.) foi o indicador do grau de infecção parasitária utilizado neste experimento e também foi usado para estimar o nível de susceptibilidade ou resistência do rebanho a esta infecção. As Figuras 2 e 3 apresentam os resultados dos exames parasitológicos realizados.

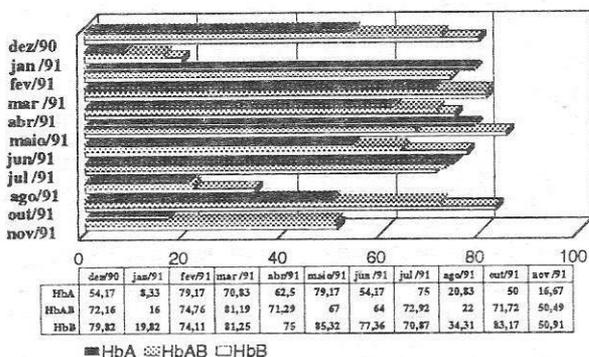


FIGURA 2 – Percentagem de ovinos positivos para a contagem de ovos por grama de fezes O.P.G., de acordo com o tipo de hemoglobina no período de dezembro de 1990 a novembro de 1991

Os resultados obtidos permitem a análise das proporções entre animais negativos e positivos ao O.P.G. nos três grupos experimentais. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas nos meses de dezembro/90 (AxB), maio/91 (ABxB), junho/91 (AxB, ABxB), outubro/91 (AxB) e novembro/91 (AxAB, AxB). Nestes meses, os ovinos com HbB apresentaram uma percentagem significativamente maior de animais positivos para o O.P.G. em relação aos ovinos pertencentes aos outros dois grupos experimentais. No mês

de julho/91 estes ovinos apresentaram uma percentagem de animais positivos ao O.P.G. um pouco inferior em comparação aos ovinos com HbA e HbAB, porém estas diferenças não foram significativas ($P > 0,05$). Os ovinos com HbA foram os que apresentaram os menores valores para percentagem de animais positivos para o O.P.G. mensal com diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos outros dois tipos de hemoglobina.

A Figura 3 apresenta os resultados das médias mensais do O.P.G., conforme o tipo de hemoglobina.

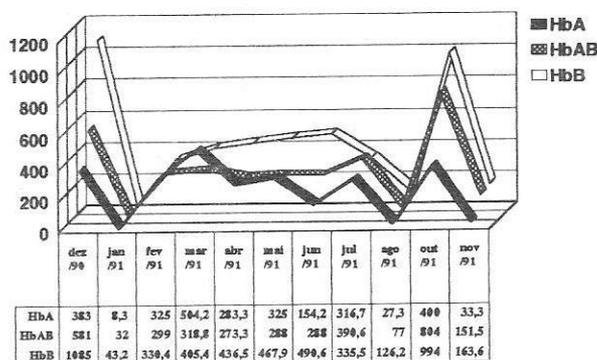


FIGURA 3 – Média de O.P.G. dos meses de coleta, conforme o tipo de hemoglobina dos ovinos

Os dados revelam que ovinos com HbA mostraram valores médios de O.P.G. mais baixos na maioria das coletas realizadas. A análise estatística dos dados indica que foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) nos meses de dezembro/90 (AxAB, AxB, ABxB), maio/91 (ABxB), junho/91 (AxB), outubro/91 (AxAB) e novembro/91 (AxAB, AxB). Os animais com HbB apresentaram médias mensais de O.P.G. significativamente superiores em relação aos animais com HbA e HbAB.

Pelos resultados observados nas Figuras 2 e 3, os ovinos com HbB foram os mais susceptíveis à verminose, pois apresentaram as maiores percentagens de animais positivos para o O.P.G. mensal, assim como, também as maiores médias de O.P.G. mensal. Da mesma forma, os animais com HbA foram os que obtiveram os melhores desempenhos, apresentando os menores valores aos exames de O.P.G. realizados. Em trabalhos dessa mesma natureza, EVANS et al. (1963) e ALTAIF e DARGIE (1978) verificaram a mesma tendência, isto é, animais com HbA são menos susceptíveis ao parasitismo. LUFFAU et al. (1981) também concluíram em seus trabalhos que ovelhas com HbA apresentavam altos níveis de resistência quando comparadas às ovelhas com HbB. EVANS et al. (1963) levantaram a hipótese de que além de fonte de alimentação, a ingesta de sangue pelo parasita seria uma fonte de oxigênio para o mes-

mo. Nesses casos, uma maior afinidade da HbA por oxigênio poderia influir no estabelecimento de uma carga parasitária.

A resistência natural do hospedeiro expressada pela contagem de ovos por grama de fezes é formada por um conjunto de fatores que incluem a competência imunológica do hospedeiro, a deficiência no estabelecimento de novas infecções, a inibição do desenvolvimento, a redução da fecundidade e o fenômeno de autocura. No presente experimento foi observado que as borregas com HbA apresentaram duas quedas acentuadas no O.P.G. médio mensal, além daquelas observadas após os tratamentos com anti-helmínticos realizados. Estas ocorreram nos meses de abril/91 e junho/91 e podem perfeitamente caracterizar, uma resistência natural desses animais às infecções parasitárias.

BRADLEY et al. (1973) também verificaram que em ovinos nativos da Flórida com uma alta frequência para HbA apresentavam uma inibição dos estágios larvários, um prolongado período pré-patente, uma infiltração eosinofílica na mucosa do abomaso e uma rápida autocura, quando comparados com ovinos de um rebanho Merino Rambouillet de baixa percentagem de HbA, Resultados similares aos apresentados nesse estudo foram novamente descritos por ALLONBY e URQUHART (1976). Os ovinos com HbA revelaram fenômeno de autocura mais eficazmente do que os ovinos com HbAB ou HbB. Examinando os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e peso corporal dos ovinos, os autores perceberam uma tendência similar, isto é, as ovelhas com HbA apresentaram melhores parâmetros hematológicos e melhor peso corporal em relação aos ovinos com HbB. ALTAIF e DARGIE (1978) em suas pesquisas verificaram que os ovinos com HbB apresentavam uma infecção 25% maior para *Ostertagia circumcincta* do que ovinos com HbA. O número de larvas inibidas de quarto estágio era estatisticamente maior ($P < 0,05$) em ovinos com HbA quando comparados com os ovinos com HbB. Os autores concluíram que as diferenças observadas poderiam ser reflexos intrínsecos do estado imunitário do hospedeiro e da interação hemoglobina-parasito.

O significado prático dessas observações sugerem que novos empreendimentos no manejo de ovinos em áreas onde a verminose é um fator limitante para produção dos mesmos, deveriam incorporar estudos sobre a performance dos três tipos de hemoglobina.

CONCLUSÕES

O alcance dos objetivos propostos para esta pesquisa pode ser demonstrado com base nos resultados observados, que permitem levar às seguintes conclusões:

1. A tipificação dos padrões de hemoglobina das 239 borregas utilizadas no experimento mostrou que o

tipo de hemoglobina predominante foi o B com 46,86%, seguido dos tipos AB e A, respectivamente com 43,10% e 10,04%. A frequência gênica para o alelo a foi de 0,32.

2. Os ovinos com HbB revelaram, durante o experimento, os maiores níveis de O.P.G., sendo os mais susceptíveis à verminose. Os ovinos com HbA mostraram os menores valores de O.P.G. na maioria dos exames realizados, sendo os mais resistentes às infecções por helmintos gastrintestinais. Os ovinos com HbAB apresentaram níveis de O.P.G. intermediários aos dois grupos anteriores.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AKAGI, S.; WATANABE, S.; SUZUKI, S. Studies on the serological constitution of sheep III. Haemoglobin and serum transferrin polymorphism s. *Animal Breeding Abstract*, Edinburg, v. 38, abst. 1458, 1970.
- ALLONBY, E.W.; URQUHART, G.M. A Possible relationship between haemonchosis and haemoglobin polymorphism in Merino sheep in Kenya. *Research in Veterinary Science*, London, v. 20, n. 2, p. 212-214, 1976.
- ALTAIF, K.I.; DARGIE, J.D. Genetic resistance to helminths II. *Parasitology*, Cambridge, v. 77, n. 1, p. 177-187, 1978.
- BRADLEY, R.E.; RAHAKRISHNAN, C.V.; PATIL-KULKARNI, V.G.; LOGGINS, P.E. Responses in Florida native and rambouillet lambs exposed to one and two oral doses of *Haemonchus contortus*. *American Journal Veterinary Research*, Chicago, v. 34, n. 6, p. 729-735, 1973.
- ECHEVARRIA, F.A.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil: A Preliminary report. *Veterinary Record*, London, v. 124, n. 6, p. 147-148, 1989.
- ECHEVARRIA, F.A. Problemas de resistência a anti-helmínticos no Mercosul (Brasil). In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande, 1996. p. 60.
- EVANS, J.V.; BLUNT, M.H.; SOUTHCOTT, W.H. The effects of infection with *Haemonchus contortus* on the sodium and potassium concentrations in the erythrocytes and plasma, in sheep of different haemoglobin types. *Australian Journal Agricultural Research*, Victoria, v. 14, n. 4, p. 548-549, 1963.
- FAN, L.C.R.; MOREIRA, E.C.; FISCHER, R. Frequência dos tipos de hemoglobina em ovinos adultos no Município de Santa Maria. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 7-11, 1981.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council on Science and Industrial Research*, Sidney, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.
- GRAY, G.D. Genetic resistance to haemonchosis in sheep. *Parasitology Today*, Essex, v. 8, p. 253-255, 1987.
- JILEK, A.F.; BRADLEY, R.E. Haemoglobin types and resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *American*

- Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 30, n. 10, p. 1773-1778, 1969.
- KASSAI, T.; FESUS, L.; HENDRIKX, W.M.L.; TAKATS, C.S.; FOK, E.; REDL, P.; TAKACS, E.; NILSSON, R.; LEVWEN, M.A.W.; JANSEN, J.; BERNADINA, W.E.; FRANKENA, K. Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental *Haemonchus contortus* infection in Merino lambs? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 37, n.1, p. 61-67, 1990.
- LE JAMBRE, L.F. The epidemiology and control of eastrointestinal parasites of sheep in Australia. In: DONALD, A.D.; SOUTHCOTT, W.H.; DINEEN, J.K. **Host genetic factors in helminth control**. Austrália: CSIRO, 1978. Cap. 9, p. 137-141.
- LUFFAU, G.; PERY, P.; PETIF, A. Self-cure and immunity following infection and reinfection in ovine haemonchosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 9, p.57-67, 1981.
- MACIEL, S.; GIMÉNEZ, A.M.; GAONA, C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. La prevalencia de la resistência antihelmintica en nematodos parasitos deovinos en el sur de latinoamerica: Paraguay. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996. p. 61.
- MOREIRA, E.C.; FAN, L.C.R.; SANTIAGO, M.A.M. Produção de hemoglobina C em resposta à estimulação parasitária por *Haemonchus contortus* e anêmia aguda em ovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 7, p. 13-17, 1982.
- PRESTON, J.M.; ALLONBY, E.W. The influence of breed on the susceptibility of sheep and goats to a single experimental infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Record**, London, v. 103, p. 509-512, 1978.
- PRESTON, J.M.; ALLONBY, E. W. The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science**, London, v. 26, n. 1, p.134-139, 1979.
- RIBEIRO, L.A.O. **Perdas reprodutivas em ovinos no Rio Grande do Sul: causas e soluções**. Porto Alegre: FEPAGRO, 1997. 18p. (Circular Técnica, 14).
- RIFFKIN, G.G.; DOBSON, C. Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 5, p. 365-378, 1979.
- ROBERTS, J.L.; SWAN, R.A. Quantitative studies of ovine haemonchosis I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 165-171, 1981.
- ROBERTS, J.L.; SWAN, R.A. Quantitative studies of ovine haemonchosis II. Relationship between total worm counts of *Haemonchus contortus*, haemoglobin values and body weight. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 201-209, 1982.
- SANTIAGO, M.A.M.; COSTA, U.C. Resistência de *H. contortus*, *T. columbriformes* e *Ostertagia* spp. ao levamisole. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 9, n. 3, p. 315-318, 1979.
- SANTOS, V.T.; FRANCO, E.B.O. O Aparecimento de *Haemonchus* spp.resistente ao radical benzimidazole em Uruguaiiana. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE PARASITOLOGIA, 1., 1967, Santiago, **Anais...** Santiago, 1967. p. 105-106.
- SANTOS, V.T.; GONÇALVES, P.C. Verificação de estirpe de *H. contortus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 201-211, 1968.
- STEWART, M.A.; MULLER, R.F.; DOUGLAS, J.R. Resistance of sheep of different breeds to infestation by *Ostertagia circumcincta*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 55, n. 12, p. 923-930, 1937.
- TEMPLETON, J.W.; SMITH, R.; ADAMS, G. Natural disease resistance in domestic animals. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 192, n. 9, p. 1306-1315, 1988.
- WEIMER, T.A.; SALZANO, S.M.; HUTZ, M.H. Erythrocyte isozyms and hemoglobin types in a southeern brasilian population. **Journal Humam Evolution**, v. 10, p. 319-328, 1981.
- WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.P.; MORAES, J.C.F. Hemoglobin and transferrin types in Corriedale and Rommey-march sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 287-297, 1984.
- WHITLOCK, J.H A study of the inheritance of resistance to trichostrongylidosis in sheep. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 45, n. 3, p. 422-439, 1955.
- WHITLOCK, J.H The inheritance of resistance to trichostrongylidosis in sheep I.Demonstration of the validity of phenomena. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 48, n. 2, p. 127-133, 1958.
- ZABALZA, B.A. Resistência genética a las enfermedades en ganado ovino. In: CURSO INTERNACIONAL SOBRE PRODUCCION DE GANADO OVINO, 3., Zaragoza, 1992.

CORRELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE HEMOGLOBINA E A PERFORMANCE PRODUTIVA EM OVINOS CORRIEDALE

CLAUDIO CHIMINAZZO¹, LUIZ ALBERTO O. RIBEIRO², TANIA de A. WEIMER³

RESUMO – Os tipos de hemoglobinas foram estudados em 239 ovelhas da raça Corriedale (24 com HbA, 103 com HbAB e 112 com HbB) expostas às mesmas condições de manejo. Foi verificada uma possível associação entre a distribuição fenotípica dessa proteína com a performance produtiva (estimada pelas taxas de prenhez, cordeiros assinalados, peso e qualidade do velo). Os resultados revelaram que as taxas de prenhez e o número de cordeiros assinalados foram maiores nos ovinos com HbA, porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Os ovinos com HbA e HbAB apresentaram melhor peso de velo. A qualidade do velo foi inferior na segunda tosquia e diferenças significativas foram encontradas entre os ovinos com HbAB e HbB.

Palavras-chave: hemoglobina, ovino, performance.

THE RELATIONSHIP BETWEEN HEMOGLOBIN TYPES AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN CORRIEDALE SHEEP

ABSTRACT – Hemoglobin types was studied in 239 Corriedale sheep (24 with HbA, 103 with HbAB and 112 with HbB) exposed to the same types of management and natural conditions. The possible association of the phenotype distribution of these protein with the productive performance of the ewes (estimated by pregnancy rate, the number of marked lambs, fleece weight and fleece quality) was investigated. Results showed that the pregnancy rate and number of marked lambs was higher in the HbA group but this difference was not significant statistically. Groups HbA and HbAB showed heavier fleece weight than HbB. The fleece quality was inferior on the second shearing and significant statistical differences were encountered between the HbAB and HbB groups.

Key words: hemoglobin, sheep, performance.

INTRODUÇÃO

A heterogeneidade da hemoglobina é observada em diferentes animais e a correlação da estrutura primária da hemoglobina com sua genética tem resultado em melhores entendimentos dos mecanismos operantes nos genes que controlam a mesma (JOHN e JOHN, 1977). Os trabalhos envolvendo as hemoglobinas de ovinos começaram na década de 50. HARRIS e WARREN (1955) realizaram as primeiras pesquisas envolvendo os tipos de hemoglobina em ovinos, utilizando 12 ovelhas prenhes e observaram que três tipos diferentes de hemoglobina em ovinos podiam ser identificados.

A herança dos tipos de hemoglobina foi determinada por EVANS et al. (1956), sendo caracterizada pela existência de dois alelos codominantes, cada qual responsável pela formação de um tipo de hemoglobina. Desde então, uma extensa literatura tem se desenvolvido referente a aspectos genéticos, estruturais, fisiológicos e imunológicos. As frequências dos alelos A e B variam tanto entre as raças como entre os rebanhos de

uma mesma raça. Esta variabilidade pode ser observada, no Rio Grande do Sul, em ovinos da raça Corriedale nos trabalhos de FAN et al. (1981), MOREIRA et al. (1982) e WEIMER et al. (1984). Na opinião de AGAR et al. (1972) as distribuições polimórficas teriam, além da significância adaptativa, influência da seleção para características produtivas.

As características produtivas dos ovinos são todas grandemente influenciadas por fatores associados ao ambiente, embora fatores genéticos não possam ser excluídos. Por essas razões, alta correlação entre um único gene e as características produtivas é difícil de ser esperada.

Os primeiros trabalhos envolvendo a seleção de ovinos produtores de lã foram realizados por TURNER (1958). Mais adiante, WATSON e KHATTAB (1964), em seus experimentos, verificaram que ovelhas com HbA tinham melhor produção de lã do que aquelas com HbAB ou HbB. KROITER e AITMUHANOV (1969) verificaram que os animais com HbA apresentavam peso de velo e peso de lã limpa superior aos animais com HbAB em 10,7% e 9,3%, respectivamente.

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária DesidérioFinamor, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL

2. Méd. Vet., M.Sc. – Professor Assistente do Departamento de Medicina Animal da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL

3. Farm. Bioq., Ph.D. – Professora Titular do Departamento de Genética da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre – RS/BRASIL.
Recebido para publicação em 25/11/1997.

ARORA e ACHARYA (1972) avaliaram 529 ovinos de rebanhos indianos produtores de lã e observaram que os tipos de hemoglobina e a produção de lã não apresentavam associações significativas. Verificaram, entretanto, que na tosquia, aos seis meses de idade, os ovinos com HbB obtiveram melhor peso médio de velo do que ovinos com HbAB. KRISHNAMURTHY e RATHNASABAPATHY (1980) verificaram que ovinos HbAB apresentaram resultado superior em comparação com os outros tipos de hemoglobina, porém as diferenças não foram significativas. Em estudos sobre a qualidade da lã no mesmo rebanho, os ovinos com HbA apresentaram resultados superiores em todas as características estudadas. Os tipos de hemoglobina e o peso médio do velo em ovinos da raça Corriedale da EMBRAPA/BAGÉ também foram estudados por WEIMER et al. (1984). Conforme os autores, as diferenças encontradas foram pequenas e estatisticamente não significativas.

A relação entre a percentagem de borregas prenhes e número de cordeiros assinalados com o polimorfismo da hemoglobina revela que não existe um ponto de vista comum entre os pesquisadores. Para KING et al. (1958), MEYER et al. (1968) e OBST e EVANS (1971) os ovinos com HbA e HbAB são os que apresentam melhor fertilidade. Já EVANS e TURNER (1965), WALKER et al. (1979) e KRISHNAMURTHY e RATHNASABAPATHY (1980) acreditam que os ovinos com HbB apresentam vantagens na produção de cordeiros, considerando o número de animais nascidos e desmamados. MAYO et al. (1970) e ARORA e ACHARYA (1972) afirmam que não existem evidências de diferenças significativas para os parâmetros avaliados.

PUSER e HALL (1974) analisaram os dados de cordeiros nascidos de 2800 ovelhas da raça Scottish Blackface e concluíram que por um lado as ovelhas com HbB produziram cerca de 10% a mais de cordeiros sobre a média de animais nascidos em relação às ovelhas com HbA, mas por outro lado, a sobrevivência dos cordeiros nascidos destas ovelhas foi menor quando comparada a dos animais com HbA. Ainda, conforme os autores, os achados indicam que, sob algumas circunstâncias, a produção de cordeiros poderia ser aumentada pela seleção de ovinos com HbB.

O estudo do número de cordeiros nascidos, cordeiros desmamados, nascimentos múltiplos e insuficiência reprodutiva em ovinos da raça Corriedale no Rio Grande do Sul feito por WEIMER et al. (1984) indica que não existem diferenças significativas para as características estudadas.

Tendo em vista, a inconsistência dos achados, este trabalho se propôs avaliar a correlação do polimorfismo da hemoglobina com a performance produtiva, estimando-se a produção de lã e o peso do velo em ovinos

assinalados e pelo peso do velo em ovinos da raça Corriedale no Rio Grande do Sul, mantidos em criação extensiva. O trabalho também apresenta dados inéditos, até o momento, sobre a correlação dos tipos de hemoglobina com a qualidade do velo no mesmo rebanho.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Eletroforese do Departamento de Genética da UFRGS, no período de dezembro de 1990 a novembro de 1991. Utilizaram-se 239 borregas de dois dentes da raça Corriedale, oriundas de uma propriedade localizada no município de Dom Pedrito. Todos animais foram identificados com brincos plásticos na orelha esquerda e tatuagem na orelha direita. O grupo experimental assim constituído e identificado, foi mantido em potreiro separado do rebanho geral, obedecendo o mesmo manejo nutricional e reprodutivo dos ovinos da propriedade.

Amostras de sangue dos animais foram coletadas mediante punção venosa da veia jugular com agulhas 40x9, usando tubos de Vacutainer de 5 ml, contendo EDTA como anticoagulante. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (2.000 rpm - 5') para separar as hemácias do plasma. As hemácias sofreram três lavagens com solução salina (0,09%). A porção de eritrócitos resultante dessas lavagens foi adicionada solução de glicerol (40% de glicerol ; 60% de citrato trissódico a 5%) na proporção de 1:1 (WEIMER et al., 1981).

As hemoglobinas foram tipadas por eletroforese horizontal em gel de amido e para revelação dos padrões de hemoglobina foi utilizado o corante amido black 10 B. Deste modo, foram formados os três grupos experimentais (ovinos com hemoglobina A, AB e B).

As borregas tiveram seus pesos controlados durante o experimento, mediante duas pesagens. A primeira, foi realizada em dezembro de 1990 e a segunda ocorreu ao final do experimento, em novembro de 1991. Nas mesmas datas, os ovinos do trabalho foram esquiladoes e o peso do velo bem como a classificação da qualidade dos mesmos anotados. A classificação da lã seguiu os padrões estabelecidos pela Federação das Cooperativas de Lãs do Rio Grande do Sul-FECOLÃ. As comparações entre os tipos de hemoglobina e as características de peso corporal e peso do velo foram realizadas através de Análise de Variância e as diferenças significativas submetidas ao teste Tukey. Os dados da classificação da qualidade da lã foram analisados pelo teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia, 50 dias após a retirada dos carneiros de repasse. Para o diagnóstico foi utilizado um aparelho

Mhz, pertencente ao Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor-CPVDF. A técnica usada foi o exame da ovelha em pé sem jejum prévio. O número de ovelhas prenhes e o número de cordeiros assinalados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polimorfismo da hemoglobina nas 239 borregas utilizadas são apresentados na Figura 1. O tipo de

hemoglobina mais encontrado foi o B com 46,86%, seguido do tipo AB com 43,10% e, finalmente o tipo A, com 10,04%. Os dados indicam que a frequência gênica para o alelo **Hb B** foi de 0,68, aproximadamente o dobro do valor encontrado para o alelo **Hb A**, que foi de 0,32. Resultados similares aos apresentados na Figura 1 foram encontrados no Japão, por AKAGI et al. (1970) e em Santa Maria por FAN et al. (1981) e por MOREIRA et al. (1982) ao pesquisarem fenótipos de hemoglobina em ovinos da raça Corriedale.

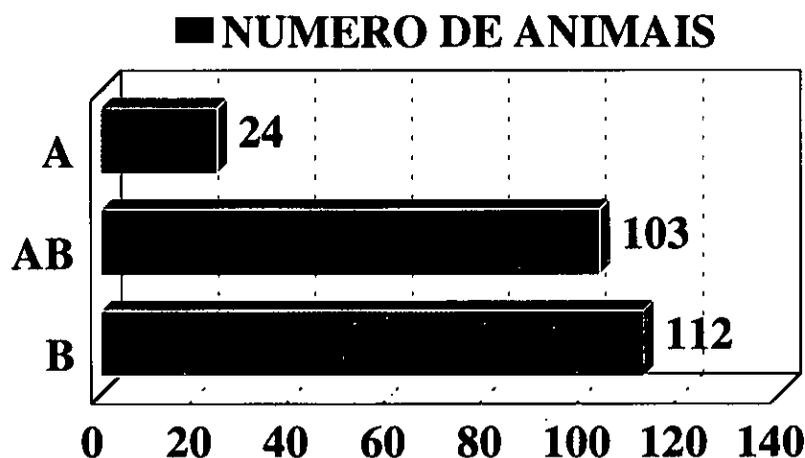


FIGURA 1 – Distribuição dos ovinos do grupo experimental, conforme o tipo de hemoglobina

WEIMER et al. (1984) trabalhando com ovinos Corriedale da EMBRAPA/Bagé, registraram em fêmeas uma frequência gênica para o alelo **Hb A** de 0,46 e para o fenótipo de HbA de 19%, bem maior que as encontradas neste experimento. Os resultados confirmam que as frequências fenotípicas e gênicas apresentam uma grande variabilidade em diferentes rebanhos ovinos

dentro da mesma raça, podendo representar, além de uma adaptação as condições do meio, influência da seleção para caracteres produtivos.

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para o peso do velo dos ovinos na 1ª e 2ª tosquia. Os ovinos com HbAB tiveram um peso médio de velo superior aos ovinos com HbB ($P < 0,05$), na segunda tosquia.

TABELA 1 – Resultados do peso médio dos velos sujos de ovinos Corriedale na 1ª tosquia, 2ª tosquia e 1ª + 2ª tosquia, conforme o tipo de Hb

TIPO DE HEMOGLOBINA	PESO MÉDIO DO VELO SUJO		
	1ª TOSQ	2ª TOSQ	1ª + 2ª TOSQ.
HEMOGLOBINA A	2,63	2,90	5,53
HEMOGLOBINA AB	2,65	2,86 ^a	5,51
HEMOGLOBINA B	2,62	2,74 ^b	5,35

^{a,b}, $P < 0,05$

Os achados de WATSON e KHATTAB (1964) e KROITER e AITMUHANOV (1969), demonstrando que os ovinos com HbA apresentavam melhor peso de velo que os outros tipos de hemoglobina, fortalecem os

resultados encontrados no presente experimento. KRISHNAMURTHY e RATHNASABAPATHY (1980) também verificaram que os ovinos com HbAB apresentavam resultado superior aos ovinos com HbB,

porém as diferenças não eram significativas ($P > 0,05$). WEIMER et al. (1984) consideraram que não havia qualquer relação entre os tipos de hemoglobina e o peso do velo de ovinos da raça Corriedale. Nesse trabalho, os autores referem que os ovinos com HbA tiveram média de peso de velo de 3,84 kg contra 3,65 kg e 3,60 kg, respectivamente, dos ovinos com HbAB e HbB.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos para a classificação da qualidade dos velos sujos da 1ª e 2ª tosquia, conforme os tipos de hemoglobina. Foram encontradas diferenças significativas na qualidade dos velos

da 1ª tosquia em relação a 2ª tosquia dentro dos grupos com HbAB e HbB. Nesses grupos de hemoglobina, verificou-se a perda da qualidade do velo na 2ª tosquia. Para os ovinos com HbAB, 81% destes tiveram a lã classificada de Amerinada à Cruza 1 na 1ª tosquia, enquanto que na 2ª tosquia este valor baixou para 51% ($P < 0,05$), aumentando consideravelmente a percentagem de ovinos com lã classificada como Cruza 2. Para os ovinos com HbB, 66% dos animais tiveram a lã classificada até Prima B na 1ª tosquia, contra 29% na 2ª tosquia ($P < 0,05$).

TABELA 2 – Classificação da qualidade do velo na 1ª e 2ª tosquia, conforme o tipo de hemoglobina

TIPO DE Hb	CLASSIF. DO VELO	1a TOSQUIA %	2a TOSQUIA %
A	AMERINADA	0,00	0,00
	PRIMA A	4,17	0,00
	PRIMA B	50,00	20,83
	CRUZA 1	20,83	29,17
	CRUZA 2	16,67	45,83
	CRUZA 3	8,33	4,17
AB	AMERINADA	1,00	0,00
	PRIMA A	5,00	0,00
	PRIMA B	42,00	18,63
	CRUZA 1	33,00	32,35
	CRUZA 2	17,00	41,18
	CRUZA 3	2,00	4,17
B	AMERINADA	0,00	0,00
	PRIMA A	16,07	1,80
	PRIMA B	50,00	27,03
	CRUZA 1	16,97	34,23
	CRUZA 2	12,50	30,63
	CRUZA 3	4,6	6,31

Também foram encontradas diferenças significativas na classificação da qualidade dos velos da 1ª tosquia entre os animais com HbAB e HbB. Nessa tosquia 48% dos ovinos com HbAB tiveram o velo classificado até Prima B, contra 66% dos ovinos com HbB ($P < 0,05$), isto é, os ovinos com hemoglobina B foram aqueles com melhor qualidade de velo na 1ª tosquia. No entanto, essa tendência de mostrar uma melhor qualidade de velo não se repetiu na 2ª tosquia.

Conforme trabalho apresentado por BLACK (1988), a taxa de crescimento da lã e várias características do velo mudam substancialmente com a idade dos ovinos. O diâmetro da fibra tende a aumentar com a idade do animal, perdendo sua qualidade, e consequentemente, piorando a classificação do velo. A perda de qualidade do velo também pode ser observada neste trabalho. MAYO et al. (1970) não encontraram evidências para qualquer real associação do comprimento da fibra

de lã, do grau de ondulações, do diâmetro da fibra, da densidade da lã e espessura da pele com os tipos de hemoglobina. KRISHNAMURTHY e RATHNASABATHY (1980) observaram que os ovinos com HbA, apresentaram qualidade superior em todas características estudadas, com diferenças significativas ($P < 0,05$) para o comprimento da fibra de lã e para o número de ondulações por centímetro, resultados divergentes aos apresentados neste trabalho.

Analisando-se o número de ovelhas prenhes, conforme o tipo de hemoglobina, pudemos verificar que dos 24 ovinos com HbA, 22 ficaram prenhes (91,67%), dos 103 ovinos com HbAB, 86 ficaram prenhes (83,49%) e dos 112 ovinos com HbB, 93 ficaram prenhes (83,04%). Estas diferenças não foram estatisticamente significantes. A percentagem média de prenhez do rebanho de 84,10%, revelou que houve um grupo de 16% de ovelhas que não mostraram prenhez.

A Figura 2 apresenta, além das percentagens de ovelhas prenhes, os dados sobre a percentagem de cordeiros assinalados em relação ao número de ovelhas prenhes, conforme o tipo de hemoglobina. Os ovinos com HbA apresentaram mais cordeiros assinalados

(63,64%) do que as ovelhas com HbAB (62,79%) e HbB (59,14%). Os dados, mesmo não apontando diferenças estatisticamente significativas, sugerem que as ovelhas com HbA apresentam uma melhor eficiência reprodutiva em relação aos ovinos com HbB.

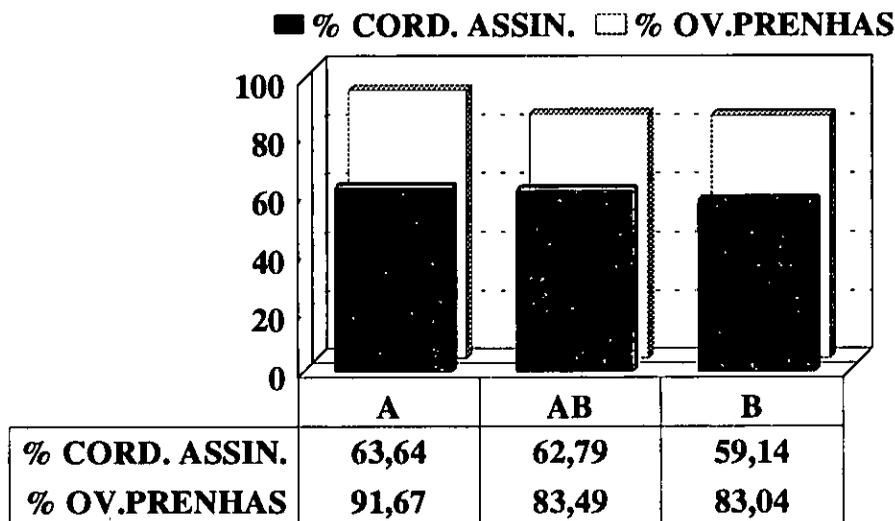


FIGURA 2 – Percentagem de cordeiros assinalados em relação ao número de ovelhas prenhes e percentagem de ovelhas prenhes, conforme o tipo de hemoglobina (Dom Pedrito/RS)

Resultados semelhantes aos apresentados nesse trabalho foram descritos por KING et al. (1958), MEYER et al. (1968), OBST e EVANS (1971) e WEIMER et al. (1984). Finalmente, considerando que o erro do diagnóstico com ultra-sonografia é baixo (ao redor de 2%), pode-se estimar a mortalidade perinatal com base na percentagem de cordeiros desmamados das ovelhas prenhes. Esses valores foram de 36,36% para ovinos com HbA, 37,21% para ovinos com HbAB e 40,86% ovinos com HbB. As diferenças não foram significativas. Os dados mostram ainda que a mortalidade perinatal média de cordeiros ficou em 38.14%, mais do que o dobro daqueles apresentados por RIBEIRO (1997), numa publicação sobre as perdas reprodutivas em ovinos no Rio Grande do Sul, onde constatou uma mortalidade perinatal de cordeiros de 19% num rebanho de ovinos Corriedale.

CONCLUSÕES

O alcance dos objetivos propostos para esta pesquisa pode ser demonstrado com base nos resultados observados, que permitem levar às seguintes conclusões:

1. A tipificação dos padrões de hemoglobina das 239 borregas utilizadas no experimento mostrou que o tipo de hemoglobina predominante foi o B com 46,86%, seguido dos tipos AB e A, respectivamente com 43,10% e 10,04%. A frequência gênica para o alelo A foi de 0,32.

2. A taxa de prenhez dos ovinos com HbA foi superior em aproximadamente 10% aos ovinos com HbAB e HbB. Ao mesmo tempo, a taxa de assinalação de cordeiros demonstrou a mesma tendência, ou seja, os ovinos com HbA apresentaram os melhores resultados.

3. O peso de velo sujo dos ovinos dos três grupos foi praticamente idêntico na 1ª tosquia. Na 2ª tosquia, o peso do velo dos ovinos com HbA e HbAB foi superior ao grupo de ovinos com HbB. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os ovinos com HbAB e HbB.

4. A classificação da qualidade do velo sujo dos ovinos nos três grupos de hemoglobina decresceu da 1ª para 2ª tosquia. Esta diferença foi significativa ($P < 0,05$) nos ovinos com HbAB e HbB.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AGAR, N.S.; EVANS, J.V.; ROBERTS, J Red blood cell potassium and haemoglobin polymorphism in sheep: a review *Animal Breeding Abstract*, Edinburg, v. 40, n. 3, p. 407-436, 1972.
- AKAGI, S.; WATANABE, S.; SUZUKI, S. Studies on the serological constitution of sheep III. Haemoglobin and serum transferrin polymorphism in sheep. *Animal Breeding Abstract*, Edinburg, v. 38, abst. 1458, 1970.
- ARORA, C.L.; ACHARYA, R.M. A note on haemoglobin and potassium types in male breed of Indian sheep and relationship with weights and wool yield. *Animal Production*, Bletchley, v.15, n.1, p. 95-97, 1972.

- BLACK, J.L. Physiological state and wool growth: age, sex and reproductive status. In: SHEEP HEALTH AND PRODUCTION, 10., 1988, Sidney. **Proceedings...** Sydney: University of Sydney, Post Graduate Committee in Veterinary Science, 1988. p. 492
- EVANS, J.V.; KING, J.W.B.; COHEN, B.L.; HARRIS, H.; WARREN, F.L. Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep. *Nature*, London, v. 178, n. 4558, p. 849-850, 1956.
- EVANS, J.V.; TURNER, H.N. Haemoglobin type and reproductive performance in Australian Merino sheep. *Nature*, London, v. 207, n. 504, p. 1396-1397, 1965.
- FAN, L.C.R.; MOREIRA, E.C.; FISCHER, R. Frequência dos tipos de hemoglobina em ovinos adultos no município de Santa Maria. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 7-11, 1981.
- HARRIS, H.; WARREN, F.L. Occurrence of electrophoretically distinct haemoglobins in ruminants. *The Biochemical Journal*, London, v. 60, n. 3, p. 29, 1955.
- JOHN, M.E.; JOHN, M. A new hemoglobin b-chain variant in sheep. *Animal Blood Biochemical Genetics*, Oxford, v. 8, n. 2, p. 183-190, 1977.
- KING, J.W.B.; EVANS, J.V.; HARRIS, H.; WARREN, F.L. The performance of sheep with differing haemoglobin and potassium blood types. *The Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 51, p. 342-346, 1958.
- KRISHANMURTHY, U.S.; RATHNASABATHY, V. Genetics of haemoglobin in Nilagiri Merino and their Cross-breed Sheep. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v. 57, p. 654-659, 1980.
- KROITER, M.K.; AITMUHANOV, Z. Haemoglobin polymorphism of sheep blood studied by agar-gel electrophoresis. *Animal Breeding Abstract*, Edinburg, v. 37, p. 256, 1969.
- MAYO, O.; COOPER, D.W.; BRADY, R.E.; HOOPER, C.W. Response to partial selection on clean fleece weight in south Australian strong-wool Merino sheep. *Australian Journal Agricultural Research*, Victoria, v. 21, n. 1-3, p. 541-547, 1970.
- MEYER, H.; WHOSE, B.; GRONING, M. A contribution to haemoglobin and blood potassium polymorphism in the sheep. *Animal Breeding Abstract*, Edinburg, v. 36, n. 1, p. 249, 1968.
- MOREIRA, E.C.; FAN, L.C.R.; SANTIAGO, M.A.M. Produção de hemoglobina C em resposta à estimulação parasitária por *Haemonchus contortus* e anêmia aguda em ovinos. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, n. 7, p. 13-17, 1982.
- OBST, J.M.; EVANS, J.V. Genotype-environment interactions in lamb mortality with particular reference to birth coat and haemoglobin type. *Animal Breeding Abstract*, Edinburg, v. 39, n. 1, 1971.
- PUSER, A.F.; HALL, J.G. Fertility and survival in hill sheep in relation to the haemoglobin type. *British Society of Animal Production*, Bletchley, v. 3, n. 1, p. 95, 1974.
- RIBEIRO, L.A.O. *Perdas reprodutivas em ovinos no Rio Grande do Sul: causas e soluções*. Porto Alegre: FEPAGRO, 1997. 18P. (Circular Técnica, 14).
- TURNER, H.N. Relationships among clean wool weight and its components. *Australian Journal Agricultural Research*, Victoria, v. 9, n. 4, p. 521-522, 1958.
- WALKER, S.R.; SMITH, D.H.; HALL, G.P.; FLAVEL, P.F.; PONZONI, R.W. Haemoglobin type and reproductive performance of sheep grazing oestrogenic pastures. *Animal Production*, Bletchley, v. 29, n. 2, p. 271-276, 1979.
- WATSON, J.H.; KHATTAB, A.G.H. The Effect of haemoglobin and potassium polymorphism on growth and wool production in Welsh mountain sheep. *Journal Agricultural Science*, Cambridge, v. 63, n. 2, p. 179-183, 1964.
- WEIMER, T.A.; SALZANO, S.M.; HUTZ, M.H. Erythrocyte isozymes and hemoglobin types in a southern Brazilian population. *Journal Human Evolution*, v. 10, p. 319-328, 1981.
- WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.P.; MORAES, J.C.F. Hemoglobin and transferrin types in Corriedale and Rommey-march sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 287-297, 1984.

A ERRADICAÇÃO DA FEBRE AFTOSA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

JOSE ANTONIO P. PRADO¹, SYLIO A. PETZHOLD¹, PAULO E. RECKZIEGEL¹, JOÃO CARLOS F. TEIXEIRA²

RESUMO – Neste trabalho é descrita, sob o ponto de vista epidemiológico e de política de saúde animal, a evolução da ocorrência da febre aftosa no Rio Grande do Sul, Brasil, e as ações e estratégias utilizadas em 30 anos de campanha de combate a enfermidade. São analisadas também as implicações do processo de erradicação tanto aquelas relacionadas ao comércio internacional de carnes, quanto as demais exigências complementares que deverão ser aplicadas no Estado de acordo com o código Zoosanitário do Escritório Internacional de Epizootias – OIE.

Palavras-chave: febre aftosa, epidemiologia, erradicação.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE ERRADICATION IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

ABSTRACT – In this paper it is described either from the epidemiological point of view and animal health policy the evolution of foot-and-mouth disease in Rio Grande do Sul State, Brasil regarding the actions and strategies adopted in 30 years of sanitary campaign against the disease. It is also analysed the implications of the disease's eradication process related not only to the international trade but also those additional requirements that must be applied by the State according the Zoosanitary code issued by the Office International des Epizooties – OIE.

Key words: Foot-and-Mouth disease, epidemiology, eradication.

INTRODUÇÃO

As ações para o controle e erradicação da febre aftosa no continente sul americano vem apresentando progressos consideráveis em várias regiões. Se reconhece atualmente que o perfil epidemiológico da febre aftosa no continente está intimamente ligado ao modelo de exploração pecuária da região, principalmente aquelas áreas com atividades comerciais intensas e sistemas produtivos semelhantes (ASTUDILLO et al., 1986). Este fato por si só determina que as estratégias de combate devem ser tomadas pelos conjuntos da áreas envolvidas e não por países ou estados separadamente, regionalizando as ações com o objetivo de se alcançar a erradicação, com a participação dos vários segmentos sociais que compõem a atividade agropastoril como os produtores rurais e a agroindústria. Especificamente no caso do Brasil, o Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) fazem parte do programa sub-regional da Bacia do Prata, que é uma região reconhecida por sua situação sanitária, como passível de concessão do "status" de área livre dentro de um mesmo país ou região obedecendo critérios de identificação de prevalência e de análise de risco.

DESENVOLVIMENTO

Histórico: A Febre Aftosa (FA) há mais de 450 anos ameaça a saúde da pecuária deixando sob risco todas as áreas do planeta sendo considerada como a mais importante das afecções transmissíveis dos animais (KITCHING et al., 1990). É uma doença vesicular, infecto-contagiosa, com grande poder de difusão, causada por um vírus da família *Picornaviridae*, gênero *Aftovirus* que afeta em forma natural os animais biungulados domésticos e selvagens. É uma das enfermidades mais devastadoras, temidas e prejudiciais, traz sérios danos à comunidade rural e graves reflexos negativos diretos e indiretos à economia dos países afetados com conseqüentes e profundas repercussões nos mercados internacionais devido às restrições à comercialização nacional e internacional de animais, seus produtos e subprodutos, impostas principalmente pelos países livres, importadores de maior potencial (COHEFA, 1988).

Citam-se, a seguir, alguns fatores que contribuem e justificam tal conceito: alta infecciosidade; extrema contagiosidade; ampla distribuição geográfica; grande variedade de animais suscetíveis e estado de portador em muitas espécies animais de grande

1. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

2. Biol. – FEPAGRO/Centro Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL. Recebido para publicação em 25/11/1997.

importância econômica como bovinos, ovinos e caprinos; duração da imunidade ativa por um período relativamente curto; fácil e rápida difusão ou disseminação; alta plasticidade do agente etiológico com conseqüente grande variedade de sorotipos e amostras antigenicamente distintas sem proteção cruzada entre si; severidade clínica com deterioração das condições corporais dos animais biungulados; persistência nas populações bovinas atingidas; grande concentração de vírus infeccioso em tecidos de animais infectados, em exsudatos de lesões e em secreções naturais mesmo antes do aparecimento de sinais clínicos; prolongada sobrevivência dos vírus no meio ambiente bem como em objetos contaminados a temperatura ambiente e grande persistência do vírus em amostras de tecidos dos animais, seus fluidos e subprodutos.

A ocorrência mais antiga da enfermidade (FA) data de 1514, na Itália. Foi feita por Hieronymus Fracostorius que relatou o surto de uma enfermidade vesicular altamente contagiosa, afetando bovinos, cuja sintomatologia era idêntica a da FA (ALONSO FERNANDEZ et al., 1973). A partir do século XVIII foi reportada em quase todo o mundo: na Alemanha em 1751 e 1756, na Itália e França durante os séculos XVII e XVIII, na Inglaterra a partir de 1839 na Dinamarca em 1841; na África e Ásia a partir do início do século XIX e na Austrália em 1872.

Nas Américas, a doença foi introduzida entre 1860-1870, possivelmente através de bovinos oriundos da Europa, onde, na época, ocorria uma grande epidemia (ASTUDILLO, 1992), cujos dados da literatura disponível indicam a cronologia que segue: 1860 – detectada na Argentina; 1865/1866 – novamente reconhecida na Argentina; 1870 – registros de ocorrências na Argentina, no Canadá, nos Estados Unidos, no Uruguai, no Chile e no Brasil – Rio Grande do Sul; 1871 – Chile, Brasil, Uruguai, Argentina e Austrália; 1895 – ocorrência de epidemia no Brasil; 1910 – primeiro registro de FA no Peru e na Bolívia e provavelmente no Paraguai; 1926 – registro de primeira ocorrência de FA no México; 1950 – na Venezuela e na Colômbia; 1956 – difusão de FA ao Equador; 1960 – a partir desta data há registros de alguns casos de curta duração, na Guiana e Guiana Francesa. Assim na América do Sul, a FA teve uma expansão gradual devido à inconsistência das medidas preventivas e isto ocasionou sua difusão, praticamente, a todos os países, com exceção do Suriname. Nos Estados Unidos, a FA não ocorre desde 1929, tendo sido eliminada nas nove vezes em que foi introduzida, por adoção de medidas de quarentena, isolamento, desinfecção e sacrifício dos animais enfermos e dos contatos. O México e o Canadá conseguiram erradicar a Febre Aftosa e mantêm-se livres da doença desde 1952. Ainda neste século, o Caribe, a Jamaica, a Martinica, o Curaçao e a Aruba, tiveram registros de ocorrência de

Febre Aftosa, a qual foi eliminada pela adoção de medidas de isolamento e quarentena, que foram facilitadas pela pequena população animal e características geográficas peculiares.

Para refrear o avanço de uma enfermidade infecciosa é necessário atuar dentro da cadeia epidemiológica nos seguintes estágios: agente etiológico, hospede suscetível e meio ambiente. Em zonas endêmicas como a América do Sul, a atuação sobre a imunidade do hospede constitui-se num elemento favorável por influir sobre o equilíbrio mantido com o agente. Uma das maiores armas utilizadas no combate a FA foi e continua sendo o estabelecimento de barreiras de imunidade adquirida ativa através da vacinação, que deve ser associada a outras estratégias de prevenção e contenção do vírus. O uso sistemático de vacinas pode reduzir marcadamente a incidência da enfermidade.

Nos primeiros anos de combate à Febre Aftosa na América do Sul, as vacinas inativadas constituíram-se quase que no único recurso utilizado. A vacina mais utilizada foi a hidróxido-saponinada (convencional). A partir de 1972, o Centro Panamericano de Febre Aftosa – CPFA – iniciou estudos, a campo, com a vacina composta com adjuvante incompleto de Freund (oleosa), que mostrou induzir uma imunidade mais duradoura e reduzir a incidência da enfermidade a níveis mais baixos do que com a vacina convencional. Desde então, a vacina oleosa vem, gradualmente, substituindo a vacina convencional por conferir um melhor nível imunitário à população bovina inclusive frente a subtipos, por aumentar seguramente o intervalo inter-vacinações, por ser vantajosa para o manejo dos rebanhos e para o custo das operações sanitárias.

A partir de janeiro de 1992, as vacinas aplicadas no Brasil deveriam ser as de longa duração ou seja, conferir uma imunidade igual ou superior a seis meses. Ainda em 1992 sugeriu-se a manutenção da estratégia utilizada na sub-região da Bacia do Prata, utilizando-se a vacina com adjuvante oleoso, única utilizada nesta área.

Prejuízos Econômicos: Os prejuízos econômicos ocasionados pela FA são conseqüência de muitos fatores associados, complexos e difíceis de quantificar, sendo apresentados na literatura com uma grande variação. Segundo a literatura, as perdas são classificadas em diretas (carne, leite, abortos, mortes, etc.) e indiretas, devido aos problemas que causam na comercialização de carnes ou ainda como sendo de curto, médio e longo prazo de acordo com o período de pós-infecção.

Presentemente as perdas foram classificadas em:

1 – **Perdas Físicas de Curto Prazo:** mortalidade; letalidade, diminuição da produtividade; abortos (natimortos); perda de peso (carne) e leite; perda total do sêmen e lesões cardíacas eventuais.

2 – Perdas Físicas de Médio e Longo Prazo: capacidade de trabalho diminuída; esterilidade; redução da capacidade reprodutiva dos animais; coadjuvação ou predisposição a infecções secundárias que são responsáveis por infecções podais, infecções bucais, mastites, metrites e mifases.

3 – Outras Perdas: proibição ou severas restrições no mercado internacional sobre a importação de animais, sobre o comércio de carne fresca, produtos de origem animal, material genético como o sêmen, embriões e óvulos, leite e leite em pó, produtos de origem animal destinados ao uso farmacêutico e produtos biológicos não estéreis; acarreta ainda limitações no trânsito e comercialização de animais e de seus produtos entre regiões com diferentes condições sanitárias; restrições ao movimento animal; exigência de tratamento prévio de elevado custo da carne a ser exportada; menor valorização dos produtos de origem animal; sacrifício dos animais; necessidade de quarentena; aumento no custo das vacinações; maiores custos com medicamentos e manejo; desestímulo ao criador; custos com limpeza e desinfecção de locais contaminados; interdição de locais ou propriedades; restrições e supervisão do movimento dentro e fora de propriedades e cercanias expostas à infecção direta ou indireta; perdas em ganhos eventuais provenientes do arrendamento de instalações; restrições a produtos agrícolas com risco de conter o vírus da Febre Aftosa; perdas na classificação de carcaças; falta de livre acesso a todos os mercados mundiais devido à caracterização dos mesmos em áreas constituídas por países sem aftosa e áreas constituídas por países com aftosa; novas restrições sanitárias que surgem dia a dia; implicações políticas, afetando ainda a nutrição de seres humanos por reduzir a oferta de proteína animal.

Os reflexos relacionados à ocorrência da FA são devidos, principalmente, a alta taxa de morbidade, perdas na produtividade, conseqüências internacionais (exportação) e nacionais (comercialização) e implicações políticas.

Assim a reputação da FA como a mais temida e danosa enfermidade transmissível dos animais, deve-se a uma complexa associação de fatores que de uma forma geral causam um profundo comprometimento à economia dos países afetados.

Áreas Livres de Febre Aftosa no Continente Americano: Os países da América do Norte, América Central e Caribe estão livres da FA, assim como o Chile, Guiana, Guiana Francesa, Uruguai e Suriname, na América do Sul. A região da Patagônia na Argentina e região norte do Chocó na Colômbia também estão livres de FA. As ilhas Malvinas também estão livres desta enfermidade.

Antecedentes: O Estado do Rio Grande do Sul foi pioneiro no Brasil no combate à enfermidade com a

implantação em 1965 da Campanha Estadual de Combate a Febre Aftosa; organizada pela Unidade de Defesa Sanitária do Departamento de Produção Animal da Secretaria de Agricultura. A partir de 1970 o plano estadual se integrou ao programa nacional de combate à febre aftosa – Ministério da Agricultura – que incluía em uma primeira etapa os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia. Em 1975 se iniciou a segunda etapa do programa nacional com a inclusão dos estados de Goiás, Mato Grosso, Rio de Janeiro e Sergipe (ASTUDILLO et al., 1986). Os demais estados da federação se integraram ao programa no decorrer dos anos seguintes. Atualmente todo o país está coberto por estratégias regionais para o controle da enfermidade, abrangendo os diferentes circuitos pecuários.

Dentre os vários êxitos alcançados pelos programas, devem ser destacados os seguintes:

- Obtenção de um sistema de informação de vigilância epidemiológica desenvolvido com o apoio do CPFA/OPS que com o decorrer dos anos foi sendo aperfeiçoado inclusive com a eleição do Rio Grande do Sul como área piloto para estudo deste sistema e que durante vários anos treinou profissionais nacionais e de outros países sul americanos com vistas a implantação futura, do que é hoje em nível continental, o sistema de informação de vigilância epidemiológica.
- Organização de uma rede de laboratórios regionais de diagnóstico distribuídos por todo o país. No Rio Grande do Sul foi designado o Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor” como laboratório regional de referência para diagnóstico das enfermidades vesiculares.
- Implantação dos testes de controle de vacinas em bovinos para avaliar a eficiência dos imunógenos disponíveis no mercado. Esta metodologia exigiu vários anos de investigação por parte do CPFA e do laboratório do MA em Porto Alegre, hoje denominado LARA/POA. Esta prova em bovinos foi aplicada posteriormente em vários países sul-americanos como teste oficial de controle de qualidade para vacinas antiaftosa.
- Introdução da tecnologia industrial para a produção da vacina antiaftosa oleosa, tecnologia esta desenvolvida durante vários anos de investigação, pelo CPFA em colaboração com o Ministério e Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul com a realização de testes de campo no município de Bagé (Fazenda Cinco Cruzes).

Em 1982, os países sul americanos reunidos no Rio de Janeiro na Comissão Sud Americana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa – COSALFA – elaboraram, aproveitando os acordos internacionais bilaterais já existentes, o documento:

- “Política e Estratégias para o Combate da Febre Aftosa na América do Sul para a década 1981-90”. Este documento previa a erradicação da enfermidade no Sul do Brasil (RS), parte da Argentina e todo o Uruguai.

Em 1986, em Porto Alegre, foi oficialmente instalado o Comitê de Erradicação da Febre Aftosa na Bacia do Prata e em 1987 foi assinado o Convênio de Cooperação Técnica Internacional entre Argentina, Brasil, Uruguai e OPS para o Controle e Erradicação da Febre Aftosa na bacia do Rio da Prata.

A meta principal estimava a erradicação da enfermidade no prazo de 5 anos nas áreas da Mesopotâmia Argentina (Entre-Rios, Corrientes e Misiones), Brasil (Rio Grande do Sul) e a totalidade do Uruguai, área esta com uma extensão de 3,9 milhões de km², 984 mil produtores e com uma população estimada, de 89 milhões de bovinos, 45 milhões de ovinos e 10 milhões de suínos. Este convênio também previa o ingresso de outras regiões e/ou países que tivessem a atividade pecuária

relacionada à região do Prata como é o caso da incorporação do Paraguai, Bolívia e também do Estado de Santa Catarina. Hoje a região abrange uma área de 6,3 milhões de km², e 140 milhões de cabeças em 1,5 milhões de rebanhos (COSALFA, 1997).

Situação Epidemiológica: O Rio Grande do Sul, desde que foi implantada a campanha estadual em 1965 com o registro oficial das ocorrências de febre aftosa, contabilizou várias situações epidêmicas para os 3 tipos de vírus, ou seja, O, A e C. Mais precisamente o RS foi afetado em 30 anos de campanha por 5 epidemias da enfermidade que atingiram um número de 18.600 focos expondo ao risco uma população 5.968.000 bovinos dos quais enfermaram 1.374.000. Nos períodos inter-epidêmicos os números de focos foram obviamente menores assim como o número de animais doentes. Na Figura 1 se pode observar a evolução da doença desde 1966 até 1996 incluído o ano de 1993 que foi o último ano com registro de casos clínicos no Estado.

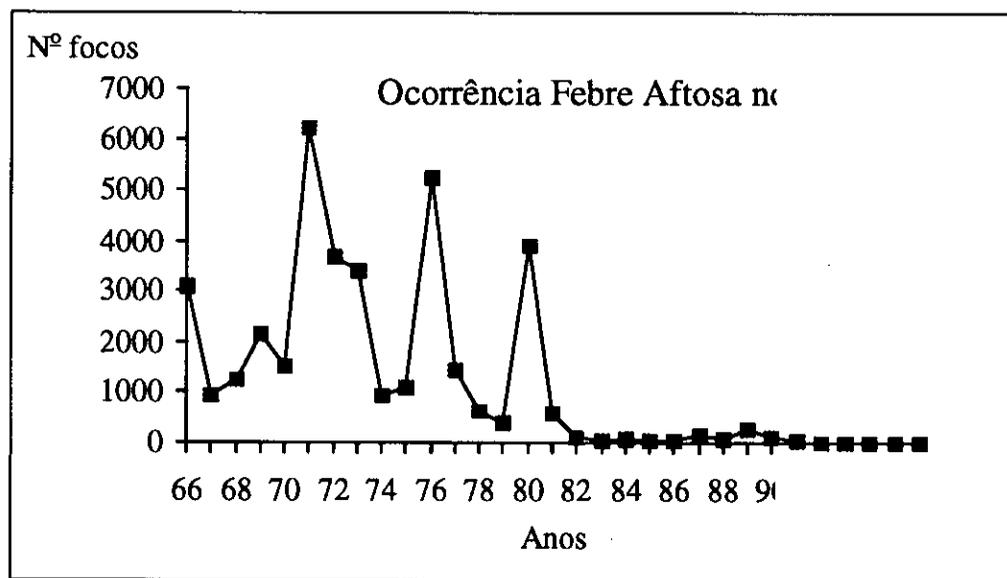


FIGURA 1 – Ocorrência de focos de Febre Aftosa no Rio Grande do Sul de 1966 a 1996

A partir da década de 80 com a introdução do teste de controle de vacinas em bovinos, com a produção industrial da vacina oleosa pela indústria privada e oficial e paralelamente à manutenção das medidas convencionais e estratégicas de defesa sanitária com um eficiente laboratório de diagnóstico, observou-se que a febre aftosa modificava gradativamente o seu perfil epidemiológico, culminando, ainda na década de 80, com uma nova caracterização da doença no RS (PLANO... DPA, SAA, 1993) com o estabelecimento de 4 áreas epidemiologicamente distintas:

- Área endêmica primária: região da Campanha.

- Área endêmica secundária: Depressão Central, Serra do Sudeste, Campos de Cima da Serra.
- Área Ocasional: Alto Uruguai, Planalto Médio.
- Área especial: Grande Porto Alegre (pela presença de laboratórios produtores de vacinas e laboratórios oficiais de diagnóstico e controle).

Com a obtenção do controle da enfermidade identificado pela modificação do seu perfil epidemiológico e acrescido da diminuição progressiva até a ausência dos casos clínicos, foram adotadas medidas de biossegurança direcionadas principalmente as áreas “especial ou de alto risco” que no caso do RS foi a re-

gião da “Grande Porto Alegre”, onde se localizavam os laboratórios oficiais e privados com a manipulação vírus ativo da febre aftosa. A introdução de medidas de segurança biológica, eliminando uma fonte de infecção importante, consolidaram significativamente as estratégias do processo de erradicação (PRADO e RECKZIEGEL, 1997).

A partir de 1988/89 com os primeiros resultados do convênio da Bacia do Prata que uniformizou as estratégias para a região, houve um decréscimo contínuo de casos clínicos de febre aftosa e que hoje se reflete nos seguintes resultados:

- Argentina: todo o país sem a ocorrência de febre aftosa desde 1994.
- Uruguai: todo o país sem febre aftosa desde 1990.
- Brasil (RS e SC): sem a ocorrência de febre aftosa desde 1994.
- Paraguai: todo o país sem febre aftosa desde 1994.

Todos estes países e/ou regiões possuem (Uruguai, Argentina e Paraguai) ou já solicitaram como o Brasil, a certificação internacional de países livres ou livres com vacinação. Independentemente do país e/ou região é importante ressaltar que todo este êxito no processo de erradicação é devido a inúmeros fatores mas o principal deles é o da integração, nas mais variadas ações, das associações de produtores, da indústria de produtos de origem animal, da indústria de imunobiológicos veterinários, e da classe veterinária oficial e privada.

Perspectivas Futuras: Todo este trabalho que vem sendo desenvolvido no Rio Grande do Sul há 32 anos, que dá ao Estado a oportunidade de certificação de “área livre com vacinação” e por continuidade a mesma situação para Santa Catarina, exigirá um grande esforço dos segmentos sociais envolvidos tanto oficiais quanto privados para a manutenção da atual estrutura dos serviços veterinários e também para implementação de estratégias complementares para que se possa atingir o estágio de “área livre” de forma definitiva. Dentre as ações complementares que são recomendadas pelo Office International des Epizooties – OIE podem ser destacadas as seguintes:

- Aumentar o controle e as restrições para o ingresso de animais susceptíveis e/ou subprodutos de origem animal de acordo com a análise de risco para a região de origem, a frequência e a quantidade da importação.
- Se possível eliminar a vacinação; se as avaliações feitas não suportarem esta ação as vacinações devem ser feitas seletivamente nas zonas de alto risco e sempre seguidas de levantamento sorológico.
- Manter sistema de informação epidemiológica que seja capaz de detectar sinais de alerta com base nos estudos de análise de risco relacionados a uma eventual introdução da doença.

- Organizar um sistema de emergência com recursos humanos treinados para a sua execução.
- Ter uma legislação adequada a situação sanitária alcançada que permita a execução das operações.
- Implantar procedimentos relacionados a educação, disseminação da informação e de cuidados relativos a prevenir os riscos de introdução da enfermidade. O público alvo é composto por os produtores rurais, indústrias dos produtos de origem animal, profissionais do setor agropecuário e de saúde animal e o público em geral.
- Manter um sistema para controle de entrada de passageiros, cargas e descargas originários de aviões, navios e veículos que eventualmente possam introduzir o vírus de febre aftosa no país/região.
- Manter um sistema sentinela de vigilância epidemiológica em áreas de risco potencial.
- Em base a uma reconhecida metodologia de análise de risco administrar as relações de comércio internacional bem como as situações dos turistas no país.

O encaminhamento futuro destas ações exigirá grande eficiência e responsabilidade, uma vez que o Brasil tendo alcançado para os estados do RS e SC uma situação diferenciada no aspecto sanitário que lhe permite abertura ao mercado internacional de carnes (circuito não-aftósico), não pode correr os riscos de reintrodução da febre aftosa nesses estados porque, além dos prejuízos óbvios, um eventual reingresso da enfermidade nesta região refletir-se-á em toda a área pioneira do Programa de Erradicação da Bacia do Prata.

Os Estados do RS e SC atingiram uma situação extremamente favorável para o seu desenvolvimento pecuário e provavelmente a curto e médio prazo os estados do Paraná e São Paulo sejam incluídos nesta mesma situação sanitária completando assim uma região geográfica e economicamente importante do país, à qual irá adicionar-se a etapa seguinte do Plano Nacional de Erradicação da Febre Aftosa – PNEFA que inclui a intensificação das medidas de controle da febre aftosa nos estados do circuito Pecuário Centro-Oeste (REGIONALIZAÇÃO... MA, 1996), com vistas à erradicação, o que será facilitado pela situação já alcançada nas regiões circunvizinhas.

CONCLUSÕES

1. As medidas de carácter técnico e financeiros, implementadas pelos governos estadual, federal e agências internacionais alcançaram os objetivos previstos e conduziram o Rio Grande do Sul ao estágio atual de “área livre de febre aftosa com vacinação”.

2. O "status" definitivo de "área livre" somente será alcançado com a manutenção de uma rigorosa vigilância epidemiológica, atendendo as exigências da O.I.E, para evitar a re-introdução da enfermidade.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; FEDERER, K. Diagnostico y referencia en la fiebre aftosa. *Boletin del Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v. 11, p. 1-12, 1973.
- ASTUDILLO, V.M.; DORA, J.F.P.; DA SILVA, A.J.M. Ecosistemas y estrategias regionales para el control de la fiebre aftosa: Aplicación en el estado del Rio Grande del Sur, Brasil. *Boletin del Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v. 52, p. 47-61, 1986.
- ASTUDILLO, V.M. A febre aftosa na América do Sul. *Hora Veterinária*, Porto Alegre, v.12, n. 70, p.16-22, 1992.
- COHEFA. Reunion Comite Hemisferico para la Erradicacion de la Fiebre Aftosa, Washington, D.C. *Informe Final*. 1988, 8 p.
- COSALFA - Reunión Comission Sud Americana de la Lucha contra la Fiebre Aftosa - Cartagena, Colombia, 24., *Informe Final*, 1997, 66 p.
- KITCHING, P.; DONALDSON, A.; ARMSTRONG, R. *Annual Report of the Institute for Animal Health*. Compton, 1990, p. 23-32,
- PLANO OPERATIVO ERRADICAÇÃO DA FEBRE AFTOSA NO RS. Porto Alegre: Departamento da Produção Animal SAA/RS. Porto Alegre, RS, 1993, 46 p.
- PRADO, J.A.P.; RECKZIEGEL, P.E. Erradicação da febre aftosa: o futuro dos Estados do Sul do Brasil. *Hora Veterinária*, Porto Alegre, v.17; n. 99, p. 21-24, 1997.
- REGIONALIZAÇÃO DAS AÇÕES PARA ERRADICAÇÃO DA FEBRE AFTOSA. Brasília: Departamento de Defesa Agropecuária, MARA, 1996. 10 p.

DIFERENÇAS EM NÍVEIS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 (BHV-1) E 5 (BHV-5)

MARJORIE F. BECK TEIXEIRA¹, PAULO AUGUSTO ESTEVES², CYNTHIA SOFIA SCHMIDT COELHO³, TAMIR CALCAGNOTTO da SILVA⁴, LILIANE GUIMARÃES OLIVEIRA⁵, PAULO MICHEL ROEHE⁶

RESUMO – Com o objetivo de comparar os anticorpos neutralizantes induzidos por infecções por herpesvírus bovinos, 508 soros bovinos foram testados pela prova de soroneutralização (SN) frente aos Herpesvírus Bovinos tipo 1 (BHV-1) e tipo 5 (BHV-5). Duzentos e quarenta e nove (49%) foram negativos para ambos os vírus, enquanto que 290 (57%) foram positivos para BHV-1 e 288 (57%) foram positivos para BHV-5. No entanto, 41 (8%) dos soros positivos para BHV-1 foram negativos para anticorpos anti-BHV-5. Por outro lado, 39 (7,7%) dos soros positivos para BHV-5, foram negativos para BHV-1. Estes resultados indicam que, se a SN for utilizada com a finalidade de avaliar o status sorológico de infecções por BHV-1 e BHV-5, os testes devem ser realizados frente aos dois tipos de vírus, uma vez que eles não induzem reatividade cruzada em todos os animais.

Palavras-chave: herpesvírus, bovino, BHV-1, BHV-5.

DIFFERENCES IN NEUTRALIZING ANTIBODY LEVELS TO BOVINE HERPESVIRUSES TYPES 1 (BHV-1) AND 5 (BHV-5)

ABSTRACT – In order to compare the neutralizing antibody response after natural bovine herpesvirus infections, 508 cattle sera were tested by serum neutralization (SN) against bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). Two hundred and forty-nine (49%) sera were negative for antibodies to both viruses, whereas 290 (57%) were positive for BHV-1 and 288 (57%) were positive for BHV-5 antibodies. However, 41 (8%) of the BHV-1-positive sera were negative for BHV-5 antibodies. On the other hand, 39 (7.7%) of the BHV-5-positive sera were negative for BHV-1 antibodies. These results indicate that, if SN is to be used to evaluate the serological status of herds to these two types of viruses, tests must be performed against both BHV-1 and BHV-5, since they do not induce fully crossreactive neutralizing antibodies.

Key words: Serum neutralization, Bovine Herpesviruses, BHV-1, BHV-5.

INTRODUÇÃO

Os principais herpesvírus bovinos identificados, no Brasil, são o Vírus da Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina ou Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) e o Vírus da Encefalite Bovina ou Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5), este último previamente considerado um subtipo de BHV-1, denominado BHV-1.3 (ROIZMAN et al. 1992). Ambos são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, sendo responsáveis por várias enfermidades que afetam os sistemas reprodutivo, respiratório e nervoso. Estima-se que 30% da população bovina do Brasil (cerca de 50 milhões de animais) esteja contaminada com o BHV-1, sendo que 50% a 70% das propriedades apresentam animais sorológica-

mente reativos perante o vírus (RAVAZZOLO et al., 1989; PITUCO et al., 1993; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995). Por outro lado, a prevalência de infecções pelo BHV-5, até há pouco tempo considerado um subtipo do BHV-1, ainda é desconhecida. Igualmente, desconhece-se qual a proporção dentre os animais supostamente infectados com BHV-1 que, de fato, foram infectados por BHV-5. Isto tem ocorrido, porque a diferenciação entre BHV-1 e BHV-5 é difícil, tanto virológica como sorologicamente, devido às extensas reações sorológicas cruzadas induzidas por ambos. Como consequência, até o momento não existe nenhum teste sorológico capaz de diferenciar infecções por BHV-1 e BHV-5 com a praticidade necessária para sua aplicação em levantamentos epidemiológicos. Embora uma

1. Méd. Vet., Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

2. Biól.- FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL. Bolsista de Aperfeiçoamento CNPq.

3. Estudante de Biologia – Departamento de Microbiologia do Centro de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DM-ICBS/UFRGS), Porto Alegre – RS/BRASIL. Bolsista de Iniciação Científica.

4. Méd. Vet., M.Sc.- IRFA Química e Biotecnologia Industrial Ltda.

5. Méd. Vet.- FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

6. Méd. Vet., Ph.D.- FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. E-mail: proche@vortex.ufrgs.br, e DM-ICBS/UFRGS. Autor para correspondência.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

variedade de ensaios imunoenzimáticos venham sendo aplicados ao diagnóstico sorológico de BHV-1, na maioria dos laboratórios do País a prova utilizada para este diagnóstico ainda é o teste de soroneutralização (SN), prova esta usualmente realizada frente a uma amostra de BHV-1, e aceita universalmente como prova sorológica padrão para o diagnóstico sorológico de BHV-1 (BITSCH, 1978).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o nível de anticorpos neutralizantes induzidos por amostras de BHV-1 e BHV-5 em bovinos naturalmente infectados e avaliar a extensão das reações cruzadas entre ambos utilizando a técnica de SN.

MATERIAL E MÉTODOS

CÉLULAS

Foram utilizadas células da linhagem de rim de bovino "Madin Darby Bovine Kidney" (MDBK) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; INLAB) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell). Todos os meios e soros foram previamente testados para assegurar a inexistência de pestívirus e anticorpos contra herpesvírus bovinos. As células foram tripsinizadas a cada 2 dias e cultivadas seguindo métodos usuais (PAUL, 1970).

AMOSTRAS DE VÍRUS E MULTIPLICAÇÃO VIRAL

Foram utilizadas as amostras Los Angeles (LA) de BHV-1, obtida do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Castelar, Argentina, e a amostra EVI 88 de BHV-5 citada em estudo prévio (ROEHE et al. 1997). A multiplicação das amostras virais foi realizada em células MDBK, como descrito (ROEHE et al. 1997). As amostras de vírus foram tituladas por métodos usuais (BITSCH, 1978).

SOROS

Quinhentas e oito amostras de soros bovinos foram obtidas do estoque de soros enviados ao CPVDF para diagnóstico.

SORONEUTRALIZAÇÃO

Os testes de soroneutralização (SN) foram realizados essencialmente como descrito por HOUSE e BAKER (1971), em placas de microtécnica, frente a 100 DICC₅₀ de cada uma das amostras virais LA (BHV-1) e EVI 88 (BHV-5), utilizando um período de incubação da mistura soro/vírus de uma hora a 37°C, antes do acréscimo de células MDBK. A leitura das placas foi feita 48, 60 e 72 horas após o início do teste. Todas as amostras de soros bovinos foram testadas em quadruplicata frente aos dois vírus. Os títulos dos soros foram determinados pelo método de Reed e Muench (LORENZ e BÖGEL, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de SN das 509 amostras de soros bovinos frente aos dois herpesvírus bovinos (BHV-1 e BHV-5) encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1 observa-se que, das amostras de soros examinadas, 290 (57%) apresentaram anticorpos neutralizantes frente à amostra de BHV-1 e 288 (56,6%) frente à amostra de BHV-5. Cento e oitenta (35,4%) foram negativas frente a ambos os vírus. Quarenta e um (8%) soros testados foram positivos somente para BHV-1, ao passo que 39 (7,7%) foram positivos somente para BHV-5. A tabela de distribuição de frequências dos títulos de anticorpos (Tabela 2) revela que a maioria (38/39) dos soros positivos somente para anticorpos anti-BHV-5 apresentaram títulos até 1:8. Por outro lado, 37 dos 41 soros positivos somente para anticorpos anti-BHV-1 apresentavam títulos até 1:8. Estes resultados indicam que os soros que deram margem a reações tipo-específicas (isto é, somente contra um dos dois vírus testados) são soros que possuem títulos baixos de anticorpos. Quando os títulos de anticorpos neutralizantes foram maiores do que 1:8, somente em 5 casos (1 soro positivo para BHV-5 com título 1:16 e 4 soros positivos para BHV-1 com títulos iguais ou maiores do que 1:16) dentre os 80 soros com anticorpos tipo-específicos, não houveram reações cruzadas.

TABELA 1 – Resultado dos testes de soroneutralização (SN) frente ao Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5) e ao Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BHV-1); (n=509)

	Anticorpos anti-BHV-5		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Anticorpos anti-BHV-1	249 * (48,9%)	41 (8%)	290 (57%)
	39 (7,7%)	180 (35,4%)	219 (43%)
TOTAL	288 (56,6%)	221 (43,4%)	509 (100%)

* Número de soros.

TABELA 2 – Distribuição de freqüências dos títulos de anticorpos neutralizantes frente ao Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5) e ao Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BHV-1) em 509 soros

		ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-BHV-5																
		<2*	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	192	256	512
ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-BHV-1	<2*	180	22	9	4	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	8	6	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	15	17	6	4	4	6	2	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	14	10	7	9	9	8	6	2	3	2	1	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	2	5	2	6	9	5	7	9	3	2	-	-	-	-	-	1	-
	24	-	-	-	-	1	-	1	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-
	32	1	3	1	1	2	3	5	4	2	3	1	2	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	1	2	2	1	1	1	-	-	1	-	-
	64	1	1	-	3	-	-	4	4	4	2	2	1	1	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	128	-	1	-	-	-	1	-	1	3	3	-	-	-	-	-	-	-
	192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	

(*) Títulos expressos como a recíproca da diluição capaz de neutralizar 100 doses infectantes para cultivos celulares (CCID₅₀) de cada uma das amostras de BHV-1 or BHV-5.

Área com fundo preto salienta soros negativos para anticorpos neutralizantes, para ambos vírus. Áreas com hachurado mais intenso salientam soros com anticorpos tipo-específicos somente.

Como, até recentemente, o BHV-5 era considerado um subtipo do BHV-1 (ROIZMAN et al., 1992), não existia a preocupação e, nem a necessidade de diferenciar estes dois tipos de vírus. Além disso, os níveis de reações sorológicas cruzadas entre ambos são amplos (BRATANICH et al., 1991).

Não obstante, existem diferenças importantes entre os dois tipos de vírus, detectáveis não só, através das características clínico-epidemiológicas das enfermidades por eles provocadas, como também nas respostas sorológicas induzidas. Foi aqui demonstrado que a SN, o teste mais frequentemente utilizado para diagnóstico sorológico de infecções por herpesvírus bovinos em nosso meio, e ainda considerada como prova sorológica padrão, detecta a maioria das reações sorológicas cruzadas. Porém, 7,7% dos soros contendo anticorpos tipo-específicos anti-BHV-5 não foram detectados pela SN frente ao BHV-1. Por outro lado, a SN frente ao BHV-5 não foi capaz de detectar 8% dos soros contendo anticorpos tipo-específicos anti-BHV-1. Estes níveis de "falsos-negativos" refletem uma população de animais que não seria identificada em levantamentos soropidemiológicos, caso as provas de SN houvessem sido

realizadas com apenas um dos tipos de vírus. Estes percentuais seriam mais do que suficientes para manter a infecção nos rebanhos, a despeito de qualquer outra medida que viesse a ser tomada buscando sua eliminação. Portanto, em situações onde o objetivo for o controle ou erradicação de herpesvírus bovinos, a SN realizada frente, somente a um desses dois tipos de vírus não deve ser tomada como parâmetro único, uma vez que o rebanho pode apresentar animais contaminados com o outro agente, os quais poderiam não ser detectados. Assim, o controle do BHV-1 poderia levar à manutenção do BHV-5 em determinada população, e vice-versa, com conseqüências imprevisíveis.

A maioria dos soros "falsos-negativos" frente a um dos tipos de vírus apresentou títulos de anticorpos tipo-específicos relativamente baixos, raramente ultrapassando 1:8. É provável, pois, que ensaios imunoenzimáticos que apresentem maior sensibilidade possam dar origem a um menor número de falsos-negativos. No entanto, que seja do conhecimento dos autores, até o presente, nenhum estudo foi feito com ensaios imunoenzimáticos levando em consideração a possibilidade de reações cruzadas entre estes dois agentes. O ideal, para determinar

a verdadeira prevalência de infecções por BHV-1 e BHV-5, deveria ser utilizar testes capazes de diferenciar as respostas sorológicas induzidas por estes dois vírus. Caso estes não se encontrem disponíveis, os testes a serem utilizados devem ser capazes de detectar todos os animais soropositivos, tanto para BHV-1 como BHV-5. Nos casos em que for utilizada a SN como prova sorológica, a mesma deve ser realizada frente a amostras de BHV-1 e BHV-5, a fim de diminuir a chance de ocorrência de falsos-negativos.

A prevalência de infecções pelo BHV-5 é desconhecida, em todo o mundo. A maioria dos relatos de infecções por este vírus referem-se a casos na Argentina (CARRILLO et al., 1983) e Austrália (FRENCH, 1962; STUDDERT, 1990). Nos Estados Unidos da América, poucas amostras do BHV-5 foram isoladas (BELKNAP et al. 1994). No entanto, estudos retrospectivos buscando reavaliar casos antigos têm revelado que, em muitas ocasiões, o vírus isolado no passado tratava-se de BHV-5, e não BHV-1 (d'OFFAY et al., 1993; ELY et al., 1996). No Brasil, casos clínicos de encefalite em bovinos dos quais são isoladas amostras de BHV-5 vem aumentando consideravelmente. A infecção tem sido detectada nos estados do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989), Mato Grosso do Sul (ROEHE et al. 1997), Paraná (ALFIERI, 1997) e, mais recentemente, no Rio de Janeiro (PITUCO, 1997). A ocorrência nos demais estados do País não é do conhecimento dos autores. Além disso, a encefalite pelo BHV-5 se apresenta com uma morbidade baixa, porém com mortalidade elevada, podendo frequentemente ser confundida com outras causas de encefalite, particularmente a raiva. Em consonância com a patogenia das infecções pelo BHV-1, a maioria das infecções com o BHV-5 provavelmente ocorre de forma subclínica ou assintomática. Portanto, apesar da ausência de informações sobre a ocorrência da infecção em outros estados, o conjunto de fatores citados sugere que o BHV-5 seja enzootico em nosso País. Estas observações reforçam a necessidade de que os testes de SN, quando utilizados em apoio a planos de controle ou erradicação, sejam realizados frente a ambos os tipos de vírus.

CONCLUSÕES

Quando testes de soroneutralização forem utilizados com a finalidade de avaliar o status sorológico de infecções por BHV-1 e BHV-5, os mesmos devem ser realizados frente aos dois tipos de vírus, uma vez que eles não induzem reatividade cruzada em todos os animais.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALFIERI, A., 1997 (Comunicação Pessoal)
- BELKNAP, E. B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Veterinary Pathology*, London, n.31, p. 358-365, 1994.
- BITSCH, V. The p³⁷ modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Copenhagen, n. 19, p. 497-505, 1978.
- BRATANICH, A.C.; SARDI, S.I.; SMITSAART, E.N.; SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. *Journal of Veterinary Medicine B*, Berlin, n. 38, p. 41-48, 1991.
- CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPICHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, Jena, n. 30, p. 327-332, 1983.
- D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle to North America. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, n. 54, p. 534-539, 1993.
- ELY, R. W.; d'OFFAY, J. M.; RUEFER, A. H.; CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Iowa, n. 8, p. 487-492, 1996.
- FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis and a virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, n. 38, p. 555-556, 1962.
- HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Veterinarian*, New York, n. 61, p. 320-335, 1971.
- LORENZ, R.J.; BÖGEL, K. Methods of calculation. In: KAPLAN M.M. and KOPROWSKY H. (Eds.) *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: World Health Organization, 1973, p. 329-332.
- LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo1 (HVB 1): inquérito soropidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 2, n. 3, p. 425-430, 1995.
- PAUL, J. *Cell and tissue cultures*. 4. ed. London: E. e S. Livingstone, 1970.
- PITUCO, E.M.; DE STEFANO, E.; PASSOS, E.C. Diagnóstico sorológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no período de 1988 a 1992. *Reunião Anual do Instituto Biológico*, São Paulo, p.16, 1993.
- PITUCO, E.M., 1997 (comunicação pessoal)
- RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.P.; MOOJEN, V. Evidências da presença de Anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil 1986. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, n.17, p. 89-95, 1989.

- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino - 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 9, n.1-2, p.13-16, 1989.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B., OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p. 41-44, 1997.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, A.A. The family *Hesperiidae*: An update. *Archives of Virology*, Viena, n.123, p. 425-449, 1992.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis virus. *Veterinary Record*, London, n.125, p.584, 1990.
- VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 2, n.3, p. 421-424, 1995.
- WEIBLEN, R.; LOMBARDO DE BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E. Bovine meningoencephalitis from IBR vírus. *Veterinary Record*, London, n.124, p. 666-667, 1989.

ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 (BHV-5)¹

RENATA SERVAN de ALMEIDA², SILVIA VALIM de MELO³, TAMIR CALCAGNOTTO da SILVA⁴, LILIANE GUIMARÃES OLIVEIRA⁵, RICARDO ANTONIO AMARAL LEMOS⁶, PAULO MICHEL ROEHE⁷

RESUMO – Dez hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcMs) contra antígenos do Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) foram selecionados por sua capacidade de ligar-se a células infectadas com amostras do Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5), em testes de imunoperoxidase (IPX). Nove dos dez AcMs produzidos reconheceram antígenos em 10/10 amostras de BHV-5 testadas. Um dos AcMs reconheceu nove entre dez amostras classificadas como BHV-5.

Palavras-chave: herpesvírus bovino, encefalite, anticorpo, BHV-5.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 (BHV-5)

ABSTRACT – Ten hybridomas secreting monoclonal antibodies (Mabs) were produced to bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) antigens. The hybridomas were selected with basis on their capacity to bind to cells infected with isolates of bovine encephalitis herpesvirus (BHV-5), in immunoperoxidase (IPX) tests. Nine of the ten Mabs recognized antigens on 10/10 isolates tested. The remainder Mab recognized antigens on nine out of ten BHV-5 samples.

Key words: bovine herpesvirus, bovine encephalitis virus, monoclonal antibodies, BHV-5.

INTRODUÇÃO

O Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* (PORTERFIELD, 1989). Este vírus é responsável por infecções no sistema nervoso central de bovinos, causando meningoencefalites não-purulentas (CARRILLO et al., 1983; WEIBLEN et al., 1989). Infecções por BHV-5 vêm despertando grande interesse devido à sua disseminação aparentemente ampla em países do hemisfério sul, bem como por sua associação com baixa morbidade e alta mortalidade (BAGUST e CLARKE, 1972). No Brasil, encefalites causadas por BHV-5 têm sido confirmadas de forma crescente nos rebanhos, principalmente nas regiões Sul e Central do País (WEIBLEN et al., 1989; RIET-CORREA et al., 1989; ROEHE et al., 1997).

As amostras hoje classificadas como BHV-5, durante muito tempo, foram consideradas subtipos do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) devido ao alto grau de homologia existente entre os genomas de ambos os vírus (ENGELS et al., 1987; BULACH e STUDDERT, 1990) e às extensas reações sorológicas cruzadas entre suas infecções (FRENCH, 1962). Portanto, a prevalência das infecções por BHV-5 é desconhecida, uma vez que,

até o presente momento, não existem testes sorológicos capazes de diferenciar estas infecções daquelas causadas por BHV-1 (ROEHE et al., 1997). Em levantamentos sorológicos, é importante a determinação dos níveis de anticorpos, tanto frente a amostras de BHV-1 quanto de BHV-5, caso contrário uma significativa proporção de amostras positivas para um ou outro agente poderá não ser detectada (TEIXEIRA et al., 1996).

Com base no interesse despertado pela existência de diferentes amostras de herpesvírus bovino e pela crescente ocorrência de infecções encefalitogênicas causadas pelo BHV-5, este estudo teve como objetivo a produção e caracterização de anticorpos monoclonais (AcMs) contra antígenos do BHV-5.

MATERIAL E MÉTODOS

Células

As células utilizadas para a produção dos antígenos virais e triagem dos hibridomas foram da linhagem MDBK (Madin Darby Bovine Kidney). Estas células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2 ml/l de enrofloxacin a 5%, seguindo metodologia usual (PAUL, 1970). As células de mieloma da linhagem Sp2/

1. Trabalho elaborado como parte da Dissertação de mestrado da primeira autora.

2. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor – CPVDF – Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

3. Estudante de graduação do Curso de Farmácia – Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DM-ICBS/UFRGS). Bolsista de Iniciação Científica.

4. Méd. Vet., M.Sc. – IRFA Química e Biotecnologia Industrial Ltda.

5. Méd. Vet. – FEPAGRO/CPVDF

6. Méd. Vet., M.Sc. – Departamento de Medicina Veterinária, UFMS.

7. Méd. Vet., Ph.D. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. DM-ICBS/UFRGS, E-mail: proche@vortex.ufrgs.br – Autor para correspondência.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

O-Ag14 foram utilizadas para a produção dos hibridomas. Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 0,3 g/l de glutamina, 0,11 g/l de dextrose, 2,3 g/l de HEPES, 2,0 g/l de bicarbonato de sódio e 50mg/ml de gentamicina. O soro fetal utilizado no crescimento celular foi previamente testado para garantir a inexistência de anticorpos específicos contra BHV-1 e BHV-5, assim como contaminação por bactérias, fungos, micoplasma e pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).

Amostras virais

As amostras de vírus foram consideradas como pertencendo ao subtipo 5 com base nas características clínico-epidemiológicas dos casos dos quais foram isoladas. Estas amostras apresentaram um perfil de reatividade distinto daquele apresentado por amostras de BHV-1 frente a AcMs produzidos contra este último (ROEHE et al., 1997). A amostra de BHV-5 "EVI 88" foi utilizada nas imunizações dos camundongos e triagem dos hibridomas. Esta amostra é proveniente de um caso de encefalite bovina e possui um perfil de reatividade compatível com BHV-5 quando testada frente a AcMs já disponíveis no laboratório (SILVA, 1995). A amostra "EVI 88" e as demais amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas dos estoques do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF) e estão citadas e referenciadas na Tabela 1.

Produção de antígeno

As células MDBK cultivadas em garrafas de ROUX receberam 5 ml/garrafa de suspensão viral a uma multiplicidade de infecção de 0,1 a 1 dose infectante/célula para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀). Quando o efeito citopático (ECP) atingiu aproximadamente 90%, a suspensão foi coletada e centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos, sendo o "pellet" de células desprezado. O sobrenadante obtido centrifugado a 100.000 x g por 2 horas. O pellet de vírus foi então ressuspensão em MEM sem SFB, sonificado a 60 microamperes (Ultrasonics Ltd.) três vezes durante 30 segundos, com intervalos de 30 segundos.

Produção de anticorpos monoclonais

Camundongos da linhagem endocruzada BALB/c com 45 a 60 dias de idade foram inoculados intraperitonealmente com uma emulsão contendo 250ml de antígeno viral e 250ml de adjuvante completo de Freund (ACF). Estes camundongos foram reinoculados duas vezes com intervalos de 21 dias, com uma emulsão semelhante, somente substituindo o ACF por adjuvante incompleto de Freund. Cinco dias antes de cada fusão, os mesmos foram inoculados via intravenosa com 200ml de antígeno viral sem adjuvante. O método para a preparação dos hibridomas foi essencialmente descrito por

KÖHLER e MILSTEIN (1975) com algumas adaptações sugeridas por HARLOW e LANE (1988): o baço do camundongo imunizado foi removido, os esplenócitos foram separados com o auxílio de pinças e lavados duas vezes com meio RPMI sem SFB. As células de mieloma foram lavadas uma vez igualmente em meio RPMI sem SFB e misturadas aos esplenócitos numa proporção de 4 a 8 linfócitos para uma célula de mieloma. A mistura foi submetida a um processo de lavagem e a fusão das células foi realizada pela adição cuidadosa de polietilenoglicol (PEG) fundido a 56°C e diluído a 30% em meio RPMI sem SFB contendo 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a fusão, a mistura foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos e o pellet celular ressuspensão em 60 ml de meio RPMI suplementado com HAT (Hipoxantina 0,1 mM, Aminopterina 0,0004 mM, Timidina 0,016 mM) e 20% de SFB. A suspensão celular foi distribuída em microplacas de 96 orifícios a uma concentração de 1x10⁶ células/ml e as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 3% de CO₂. O meio HAT foi trocado em 50% no terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dias após a fusão. No décimo sétimo dia, o meio HAT foi substituído em 50% por meio RPMI contendo HT (Hipoxantina 0,1mM e Timidina 0,016mM) e 10% de SFB que, por sua vez, também foi trocado em 50% por mais quatro vezes. Os hibridomas produtores de anticorpos para amostra EVI 88 foram triados pela técnica de imunoperoxidase (IPX), expandidos e clonados por, no mínimo, duas vezes através da técnica das diluições limitantes (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). Os hibridomas clonados foram testados frente a 25 amostras de herpesvírus em testes de IPX e em sua capacidade de produzir anticorpos neutralizantes em testes de soroneutralização.

Imunoperoxidase (IPX) sobre cultivos celulares

O teste de IPX permite a seleção dos hibridomas positivos, através da capacidade de ligação dos AcMs produzidos por estes, às células infectadas (SILVA, 1995). Células MDBK foram cultivadas em microplacas de 96 orifícios e infectadas com 100 DICC₅₀ da amostra viral EVI 88. Quando evidenciado o início do ECP as placas foram submetidas à fixação das células com acetona a 20% e secagem a 37°C durante 4 horas. Para a execução do teste de IPX, as células foram reidratadas por 5 minutos com PBS T-80 (8,5 g NaCl; 1,55 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,23 g; NaH₂PO₄·H₂O; 5 ml Tween 80; H₂O q.s.p. 1 l). Após a remoção do líquido hidratante, foram adicionados às placas 50 ml de sobrenadante puro do cultivo dos hibridomas. Soro controle positivo (soro policlonal anti-EVI 88 produzido em camundongos) e negativo (soro de camundongos normais) foram incluídos em cada teste. As placas foram submetidas a incubação a 37°C durante 15 minutos e, logo a seguir, a três

lavagens com PBS T-80. Foram adicionados, então, 50 ml de conjugado peroxidase/anti imunoglobulina de camundongo (Sigma), adequadamente diluído em líquido de diluição (29,5 g NaCl; 1,55 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,23 g NaH₂PO₄·H₂O; 5 ml Tween 80; H₂O q.s.p. 1 l; pH 6,4) e subsequentemente as placas foram novamente incubadas a 37°C por 15 minutos. Após novo processo de lavagem, a prova foi revelada pela adição do substrato AEC (15 ml dimetil-formamida; 0,1 g 3-amino-9-etilcarbazol) diluído como recomendado (HARLOW e LANE, 1988).

Isotipagem dos AcMs

Os isotipos dos AcMs produzidos foram determinados através de um teste imunoenzimático do tipo ELISA de captura, adquirido comercialmente (Sigma) e seguindo metodologia recomendada pelo fabricante.

Análise da reatividade dos AcMs por IPX frente às amostras virais

O teste de IPX também foi utilizado para análise da atividade dos anticorpos monoclonais produzidos frente a diferentes amostras de BHV-1 e BHV-5 listadas na Tabela 1. O teste foi realizado como descrito na triagem dos hibridomas e repetido, no mínimo, uma vez.

Teste de soroneutralização (SN)

O teste de SN foi utilizado para a avaliação da capacidade neutralizante dos AcMs produzidos, frente a

amostra "EVI 88", isolada em 1995 a partir de um caso de encefalite (ROEHE et al., 1997). Para a realização do teste seguiu-se essencialmente protocolo descrito por HOUSE e BAKER (1971). Para a avaliação da capacidade neutralizante dependente de complemento, o teste de SN foi repetido na presença de 10% de soro de cobaio como fonte de complemento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados dez hibridomas reativos para a amostra EVI 88 de BHV-5. Estes hibridomas foram denominados BBD10, 2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D2, 3D11, 5E2 e 6A2. A isotipagem dos hibridomas revelou que um dos AcMs (BBD10) era pertencente à classe IgM. Os demais AcMs (2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D2, 3D11, 5E2 e 6A2) são pertencentes à classe IgG₁. No teste de SN, nenhum dos AcMs produzidos apresentou capacidade neutralizante frente à amostra EVI 88, tanto na presença como na ausência de complemento.

Teste de IPX para análise da reatividade dos AcMs frente às amostras virais:

Os dez hibridomas positivos foram analisados frente às 10 amostras de BHV-5. O resultado desta análise encontra-se na Tabela 2. Nove dos AcMs produzidos reconheceram antígenos em todas as amostras de BHV-5. O AcM BBD10 reconheceu todas as amostras de BHV-5 testadas, à exceção da amostra EVI 190.

TABELA 1 – Amostras de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) utilizadas na caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos, de acordo com o quadro clínico associado e procedência

AMOSTRA	QUADRO CLÍNICO	PROCEDÊNCIA
EVI 88	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 345	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 190	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 289	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 214	Encefalite	CPVDF ¹
TAIM	Encefalite	UFPEL ²
SV 136/88	Encefalite	HEINLEIN et al., 1993 ³
A 663	Encefalite	CARRILLO et al., ⁴ 1983
AA 01	Encefalite	FUEL ⁴
AA 05	Encefalite	FUEL ⁴

1- Amostras isoladas no Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor; 2- Amostras gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Telmo Vidor, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL); 3- Amostras cedidas pelo Prof. Dr. Rudi Weiblen, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); 4- Amostras cedidas pelo Prof. Dr. Amauri Alfieri, Fundação Universidade Estadual de Londrina (FUEL); ** De acordo com SILVA, (1995)

TABELA 2 – Perfil de reatividade dos anticorpos monoclonais (AcMs) produzidos, frente a diferentes amostras de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5)

Amostras de vírus	AcMs									
	BB D10	2B6	2C3	2C5	3A2	3B1	3D2	3D1	5E2	6A2
EVI 88	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
EVI 345	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
EVI 190	.	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
EVI 289	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
EVI 214	2+	4+	2+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
TAIM	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
SV136/88	2+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
A 663	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
AA 01	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
AA 05	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+

Obs: – Reação negativa; 1+ Reação de intensidade baixa; 2+ Reação de intensidade média; 3+ Reação de intensidade forte; 4+ Reação de intensidade muito forte

Devido ao elevado nível de semelhança antigênica entre BHV-1 e BHV-5, pouca importância vinha sendo dada ao BHV-5 como agente de uma enfermidade distinta daquelas causadas por amostras típicas de BHV-1. No hemisfério norte, mesmo em casos de encefalite associadas a herpesvírus bovinos, a maioria das amostras de vírus isoladas tem sido BHV-1, e não BHV-5 (d'OFFAY et al., 1993). A similaridade antigênica entre os dois tipos de vírus, associada à pequena ocorrência do BHV-5 naquele hemisfério, certamente vinham contribuindo para o limitado conhecimento sobre a epidemiologia de infecções pelo BHV-5, bem como sobre sua importância para a pecuária mundial. Por esta razão, com o intuito de fornecer subsídios para a análise de infecções por BHV-5 e das características antigênicas desse tipo de vírus, o presente estudo foi realizado visando a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos do BHV-5. A amostra EVI 88 foi escolhida para a produção dos AcMs por ter sido isolada de um caso clínico típico de encefalite bovina, além de apresentar um perfil de reatividade comum às demais amostras de BHV-5 disponíveis no laboratório, quando testada frente a AcMs preparados com antígenos de BHV-1 (SILVA, 1995). Além disso, seu perfil de restrição enzimática é similar ao de outras amostras de BHV-5 descritas na literatura (d'OFFAY et al., 1993; HEINLEIN et al., 1993), e distinto daquele apresentado por amostras de BHV-1 (dados não apresentados).

Para a triagem dos hibridomas, titulação e caracterização dos AcMs produzidos frente às amostras virais, o teste escolhido foi a IPX. Embora outros autores tenham utilizado ensaios imunoenzimáticos do tipo

ELISA com essa finalidade (CHANG et al., 1986; MARSHALL et al., 1986; SHEN et al., 1981), trabalhos anteriores realizados pelo mesmo grupo (SILVA, 1995) evidenciaram que o teste de ELISA por vezes não permitia uma diferenciação clara entre resultados positivos e negativos, gerando um grande número de resultados inconclusivos por ocasião da seleção dos hibridomas, o que dificultava em muito o trabalho de triagem. O teste de IPX, embora menos sensível que os ensaios imunoenzimáticos (HARLOW e LANE, 1988), se mostrou bastante eficaz e seguro na diferenciação dos resultados positivos e negativos, facilitando a operacionalização das triagens. Não obstante, em trabalhos futuros, seria conveniente utilizar o teste de ELISA como prova adicional ao IPX na seleção de hibridomas, uma vez que é possível que alguns anticorpos sejam reagentes somente em testes de ELISA, e não à IPX. Assim, alguns AcMs poderiam ser reconhecidos por somente um dos dois métodos de triagem, os quais, nesse caso, poderiam ser perdidos.

Igualmente, para a caracterização dos AcMs produzidos frente a diferentes amostras de herpesvírus, a principal ferramenta utilizada também foi o teste de IPX. Por esta técnica, nove dentre os dez AcMs obtidos reagiram com todas as amostras de BHV-5. Esta constatação revela que os AcMs aqui obtidos apresentam potencial para uso com ferramentas para o diagnóstico de infecções pelo BHV-5. Em estudo prévio foi demonstrada a possibilidade de diferenciar entre amostras de BHV-1 e BHV-5, porém, somente através da ausência de reatividade de AcMs anti-BHV-1 frente a algumas amostras de BHV-5 (SILVA, 1995; ROEHE et al., 1997).

Em comparação com aqueles, os AcMs anti-BHV-5 aqui descritos representam um passo evolutivo, uma vez que os mesmos reconhecem positivamente epitopos presentes em amostras de BHV-5. No entanto, não foi ainda avaliada a capacidade de reação dos mesmos frente a amostras de BHV-1 ou outros herpesvírus. Esta avaliação permanece mandatória, e deverá ser realizada em estudos futuros, envolvendo um número significativo de amostras de herpesvírus bovinos e de outras espécies.

Um dos AcMs (BBD10) reconheceu um epitopo comum a nove das dez amostras de BHV-5 aqui testadas. Este AcM merece atenção especial, pois foi o único que apresentou perfil de reatividade distinto dentre todos os dez AcMs obtidos. No entanto, seu perfil de reatividade distinto já permite antever diferenças entre as amostras de vírus classificadas como tipo 5. Estas diferenças, na verdade, tem sido também detectadas em testes de neutralização cruzada (dados não apresentados).

A maioria dos AcMs aqui produzidos reagiu com quase todas as amostras de BHV-5 testadas. O perfil uniforme de reatividade dos AcMs obtidos revela a existência de epitopos imunodominantes na preparação antigênica utilizada. Isto indica que a obtenção de AcMs que reconheçam diferenças menores entre amostras provavelmente necessitarão de preparações de antígeno mais purificadas. A utilização de antígenos preparados com proteínas purificadas por eletroforese ou por imunoafinidade poderiam ainda proporcionar preparações contendo epitopos mais raros, aumentando assim a chance de obtenção de AcMs com maior capacidade discriminatória (HARLOW e LANE, 1988).

Estudos subsequentes deverão ser realizados a fim de determinar com precisão em que proteínas encontram-se os epitopos reconhecidos por estes AcMs. Além disso, a avaliação dos mesmos frente a outros herpesvírus, particularmente BHV-1, será objeto de estudo futuro.

CONCLUSÕES

1— Os AcMs produzidos foram capazes de reconhecer antígenos em todas as dez amostras de BHV-5 testadas no presente trabalho.

2— Os perfis de reatividade obtidos sugerem que existem diferenças antigênicas entre amostras de BHV-5.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BAGUST, T.J.; CLARKE L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *Journal of Comparative Pathology*, London, v. 82, p. 375-383, 1972.
- BULACH, D.M.; STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. *Archives of Virology*, Viena, v.113, p.17-34, 1990.
- CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPICHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, Jena, v. 30, p. 327-332, 1983.
- CHANG, L.W.S.; ZEE, Y.C.; PRITCHETT, R.F.; ARDANS, A.A. Neutralizing monoclonal antibodies directed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Archives of Virology*, Viena, v. 88, p. 203-215, 1986.
- D'OFFAY, J.M., MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle to North America. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 54, p. 534-539, 1993.
- ENGELS, M.; GIULIANI, C.; WILD, P.; BECK, T.M.; LOEPF, E.; WYLER, R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research*, Amsterdam, v. 6, p.57-73, 1986.
- FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis and a virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, v. 38, p. 555-556, 1962.
- HARLOW, E; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory: Cold Spring Harbour, New York, 1988. 726 p.
- HEINLEIN, A.; METZLER, A. E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A. A.; RODRIGUEZ, M. Molecular characterization of south american bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *Journal of Veterinary Medicine B*, Berlin, v. 40, p.125-130, 1993.
- HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Veterinarian*, New York, v. 61, p.320-335, 1971.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, London, v. 256, p. 495-497, 1975.
- MARSHALL, R.L.; RODRIGUEZ, L.L. LETCHWORTH III, G.J. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *Journal of Virology*, Washington, v. 3, p.745-753, 1986.
- PAUL, J. *Cell and tissue cultures*. 4. ed. London: Livingstone, 1970. 470p.
- PORTERFIELD, S.J. *Andrewes' viruses of vertebrates*. 5. ed. London: Baillière Tindall, 1989. 457 p.
- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino - 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 9, n.1/2, p.13-16, 1989.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B., OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da

rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.

SHEN, D.T.; BURGER, D.; LI, Z.; GORHAM, J.R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type 1, Los Angeles strain. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 28, p. 25-37, 1991.

SILVA, T.C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. Porto Alegre, UFRGS, 1995. 73p. Dissertação (Mestrado) – Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TEIXEIRA, M.B.; ROEHE, P.M.; COELHO, C.S.S.; TEIXEIRA, J.C.; ROSA, J.C.A.; SILVA, T.C. Evaluation of antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1)

and 5 (BHV-5) in cattle by serum neutralization. In: *ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA*, 8., 1996. *Anais...* São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 24-27/11. p. 22

WEIBLEN, R.; LOMBARDO DE BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. *Veterinary Record*, London, v. 124, p. 666-667, 1989.

AGRADECIMENTOS

Pelo apoio na realização do trabalho de pesquisa, agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ANTIGÊNICA E IMUNOGÊNICA ENTRE AMOSTRAS DE CAMPO E AMOSTRAS VACINAIS DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL, ATRAVÉS DO "WESTERN BLOTTING"

HAMILTON LUIZ de SOUZA MORAES¹, CARLOS TADEU PIPPI SALLE², VLADIMIR PINHEIRO do NASCIMENTO²

RESUMO – Foram analisadas cinco amostras de vírus da Doença Infecciosa Bursal (DIB), isoladas de frangos de corte no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) e quatro amostras de vírus vacinais utilizados em vacinas comerciais, quanto às suas características antigênicas e imunogênicas. Inoculou-se em cobaias, 10² DIE (Dose Infecciosa para embrião)/50 ml de uma suspensão de cada um dos vírus, replicados na membrana cório-alantóide de embrião de galinha (MCA). As amostras foram submetidas ao Sódium dodecyl sulfato – eletroforese gel de poliácridamida (SDS-PAGE), o perfil protéico de cada uma foi avaliado através do "western blotting" e cruzadas com todos os anti-soros induzidos por elas, chegando-se a conclusão de que as proteínas virais encontradas nos antígenos de campo e de vacina eram semelhantes, mostrando um padrão idêntico ao descrito na literatura para o sorotipo 1 do vírus da DIB, isto é, VP1 86 kDa, VPX 48 kDa, VP2 37 kDa, VP3 34 kDa e VP4 28 kDa. Assim sendo, chegou-se a conclusão de que os problemas da DIB no sul do Brasil se devem mais a doenças intercorrentes, programas de vacinação, título e tipo de vacinas utilizados, do que a cepas variantes do sorotipo 1 do vírus.

Palavras-chave: patologia aviária, avicultura, sanidade avícola, medicina de aves, doenças infecciosas, aves, doença infecciosa da bursa: relação antigênica e imunogênica, "western blotting".

ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC RELATIONSHIP BETWEEN FIELD AND VACCINAL SAMPLES OF THE INFECTIOUS BURSAL DISEASE: A COMPARATIVE STUDY

ABSTRACT – Five samples of Infectious Bursal Disease (IBD) virus, isolated from broilers at the Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology (CDPA) and four samples of commercially available vaccinal viruses were analyzed, regarding their antigenic and immunogenic characteristics. A suspension of 10² IDE/ 50 ml of each CAM- replicated virus was initially inoculated in guinea pigs. The samples were then subjected to the SDS-PAGE, and the protein profile of each one was evaluated, by means of a "western blotting" procedure. The samples (field and vaccinal) were crossed against all antiserum produced by the former, which allowed the reaching of the following conclusions: there is a similarity among the viral proteins found in the field samples, which are also identical to the standard described in the literature for IBD serotype 1, i.e. VP1 86 kDa, VPX 48 kDa, VP2 37 kDa, VP3 34 kDa, and VP4 28 kDa. It can also be concluded that IBD problem in the south of Brazil would be due, in a greater extent, to intercurrent diseases, vaccination programmes and vaccine type and titer used, rather than by variant strains of virus serotype 1.

Key words: avian pathology, poultry, poultry health, medicine, infectious diseases, birds, infectious bursal disease: antigenic and immunogenic relationship, western blotting.

INTRODUÇÃO

Estudando as propriedades biofísicas e bioquímicas, DOBOS (1979) caracterizou o vírus da DIB como um membro da família Birnaviridae, que inclui também alguns vírus de peixe, moluscos e de drosófila. Conforme MÜLLER et al. (1979), o vírus tem entre 55 e 65 nm de diâmetro, não é envelopado e é composto por um RNA de dupla hélice com um genoma bissegmentado, designados segmentos A e B. Estes segmentos codificam as proteínas estruturais do vírus que são denominadas de VP1, VPX, VP2, VP3 e VP4 de acordo com DOBOS (1979).

SALLE (1989), trabalhando com pintos de 1 dia de idade, com níveis de anticorpos maternos variáveis e provenientes de quatro empresas avícolas, observou que após a agressão com uma amostra clássica do sorotipo 1 do vírus da DIB (52/70), aos 14 e 21 dias, a proteção por anticorpos maternos, induzidos por vacinas produzidas com amostras virais também do sorotipo 1, variou entre 7% e 100%. O autor chegou à conclusão que investigar os programas de vacinação, os métodos de aplicação das vacinas, a cepa vacinal (suave, intermediária ou forte) e as doenças intercorrentes eram, naquele momento, mais importantes do que a procura de cepas variantes do vírus da Doença de Gumboro (DG).

1. Méd. Vet., M.Sc. – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA. Convênio Faculdade de Veterinária da UFRGS/CPVDF-FEPAGRO, Av. Bento Gonçalves 8824, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

2. Méd. Vet., Ph.D. – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA. Convênio Faculdade de Veterinária da UFRGS/CPVDF-FEPAGRO, Av. Bento Gonçalves 8824, 91540-000 Porto Alegre – RS/BRASIL.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

Mesmo com o uso intensivo de vacinas contra a DIB em todos os países de avicultura industrial, o problema persiste. Baseados em testes *in vivo* ou em provas sorológicas, vários autores sugerem o aparecimento de cepas variantes do sorotipo 1 do vírus da DIB, para explicarem a não resolução do problema.

BECHT et al. (1988), comparando os sorotipos 1 e 2 do vírus da DIB, através de SDS-PAGE e "western blotting", concluíram que há diferença entre os polipeptídeos do segmento A do genoma do vírus, sendo o sorotipo 1 maior que o 2 em torno de 70 pares de bases. No segmento B a diferença é menos acentuada, mas significativa, chegando a 20 pares de bases. Entretanto, TURE e SAIF (1992), não conseguiram estabelecer diferença entre amostras clássicas e variantes do sorotipo 1 e uma amostra do sorotipo 2 do vírus da DIB, usando o teste de "western blotting" e ensaio imunoenzimático (ELISA), com anticorpos monoclonais e policlonais, na tentativa de relacionar antigenicamente estas amostras.

As diferenças entre as amostras clássicas e variantes do sorotipo 1 foram estudadas a nível de proteína viral por vários autores. Para melhor compreensão dos problemas existentes com as falhas de vacinação e na tentativa de se chegar as proteínas do vírus indutoras de proteção, vários experimentos foram realizados. FAHEY et al. (1991), produziram anticorpos monoclonais para caracterizar os epítomos envolvidos na neutralização do vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício (IBF), e chegaram à conclusão de que somente os anticorpos monoclonais que reagiram com a proteína VP2, nas provas de "western" ou de imunoprecipitação, protegeram passivamente frangos jovens contra a infecção.

SCHNITZLER et al. (1993), determinaram, através da reação de polimerase em cadeia (PCR) e "western", que a proteína viral VP2 possui uma região central variável, a qual induz a formação de anticorpos neutralizantes. A troca de quatro aminoácidos desta região pode levar ao aparecimento de um novo sorotipo do vírus da IBF.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se haviam diferenças antigênicas entre amostras de campo e de vacina do Vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício (VIBF), através da prova de "Western Blotting", utilizando-se anticorpos policlonais induzidos por estas amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de Campo – Foram selecionadas 05 (cinco) bolsas de Fabrício (BF), oriundas de frangos de corte vacinados e não vacinados contra a DG, que foram remetidos ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) e diagnosticados como Doença de Gumboro (DG). Estes materiais receberam a seguinte numeração: 13, 15, 16, 18 e 20.

Amostras Vacinais – Foram escolhidas 04 (quatro) vacinas comerciais contra a DG, disponíveis no mercado, que foram codificadas com os números 23, 25, 26 e 27. Todas as amostras foram propagadas em membrana cório-alantóide (MCA) de embriões livres de patógenos específicos (SPF), (VILLEGAS, 1981; LUKERT e SAIF, 1991) e tituladas conforme ROSENBERGER e CLOUD (1989), antes de serem inoculadas nos cobaios (Tabela 1). Os materiais utilizados para a inoculação nos cobaios foram inativados com 0,1% de beta propiolactona de acordo com JACKWOOD e SAIF (1987).

TABELA 1 – Título das amostras, campo e vacina, em MCA de embriões de galinha SPF

Amostra	Título* (DIE50/ml)
13	$1 \times 10^{2,5}$
15	$1 \times 10^{2,8}$
16	$1 \times 10^{2,0}$
18	$1 \times 10^{3,1}$
20	$1 \times 10^{2,0}$
23	$1 \times 10^{3,5}$
25	$1 \times 10^{3,7}$
26	$1 \times 10^{3,8}$
27	$1 \times 10^{3,5}$

* Título = maior diluição que expressou as lesões do vírus da DIB na MCA de embriões SPF.

Adjuvante – Foi utilizado o adjuvante completo de Freund (ACF), marca Sigma Co., misturado em partes iguais aos antígenos (Ag), JACKWOOD e SAIF (1982).

Soros Hiperimunes – Foram administrados 4 ml de inóculo (2 ml de Ag + 2 ml de ACF), intramuscular, em cada cobaio, e 4 ml intraperitoneal 04 (quatro) semanas depois. Os inóculos continham 10^2 Dose Infecçiosa para o Embrião/50 ml (DIE/50ml) de vírus em cada amostra, sendo utilizados 05 (cinco) cobaios por antígeno. Uma semana após a última inoculação, os animais foram sangrados e os soros guardados de acordo com JACKWOOD e SAIF (1982).

SDS-Page – As proteínas estruturais das amostras foram separadas em gel de "corrida" 12,5%, e gel "stacking" 3,5%, usando um sistema SDS-PAGE conforme LAEMMLI (1970), modificado.

"Western Blot" – As proteínas estruturais dos antígenos, separadas pelo SDS-PAGE, foram examinadas pela técnica de "Western blotting", descrita por BURNETTE (1981). Após a transferência das amostras para as membranas de nitrocelulose, estas foram cortadas em tiras e incubadas com os anti-soros, pro-

venientes de animais inoculados com as amostras de campo e vacina, diluídos a 1/100. A ligação dos anticorpos foi identificada com um soro antiimunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase, marca Sigma Co., diluído a 1/2000 e incubado durante 2 horas a temperatura ambiente. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina e interrompida com a lavagem das tiras em água destilada.

Determinação do peso molecular – Os pesos moleculares, das proteínas separadas eletroforéticamente, foram determinados utilizando-se a equação

da reta, onde os pesos são calculados por aproximação tendo como base os padrões utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Resultados eletroforéticos das amostras de campo e vacina, e da amostra padrão do VIBF em SDS-PAGE

Os resultados da corrida em gel de poliacrilamida das amostras de campo e de vacina do presente trabalho, da amostra padrão do sorotipo 1 do vírus da IBF e do marcador de peso molecular, são mostrados na Figura 1.

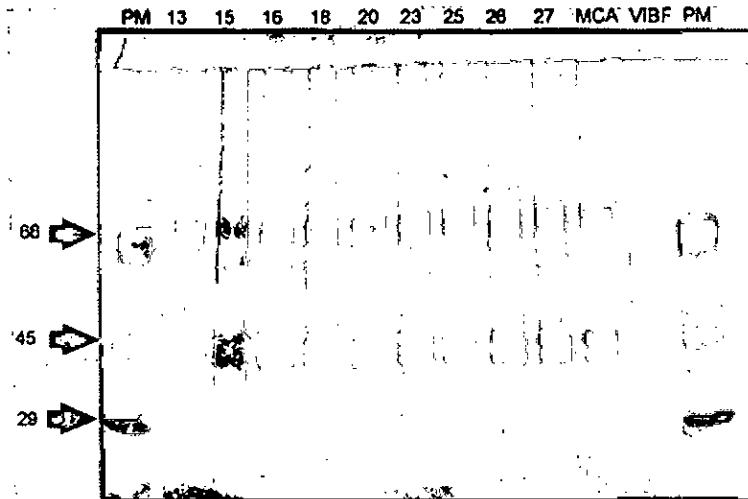


FIGURA 1 – SDS-PAGE das amostras de vírus de campo e de vacina, da mca e do VIBF

2 – Resultados da transferência das reações antígeno/anticorpos para a membrana de nitrocelulose "WESTERN BLOTTING".

Na Figura 2, está o resultado da prova onde se utilizou como antígeno uma amostra purificada de vírus da Doença Infecciosa Bursal (VDIB), do

sorotipo 1, obtida junto ao Central Veterinary Laboratory, Reino Unido, e como anticorpo os antiseros induzidos pelas amostras de campo e vacina. Foram caracterizados os antígenos com pesos moleculares de 100 kDa, 73 kDa, 69 kDa, 63 kDa, 57 kDa, 48 Kda, 30 kDa e 24 kDa.

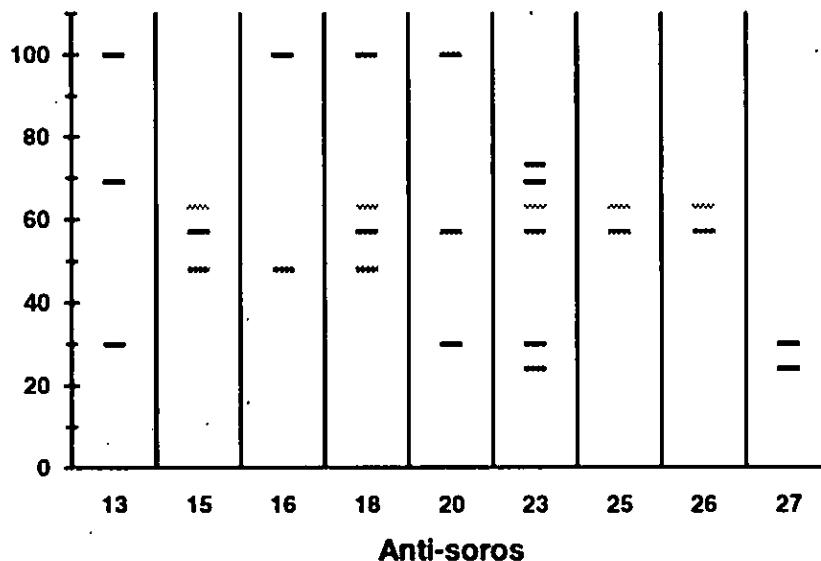


FIGURA 2 – Western blot: padrão de reconhecimento das proteínas do VDIB

Na análise das amostras de campo e vacina do presente trabalho, com os anti-soros produzidos contra elas, mostrado nas Figuras 3 a 11, vári-

as bandas foram reveladas em cada soro, com um alto grau de reatividade cruzada entre todas as amostras.

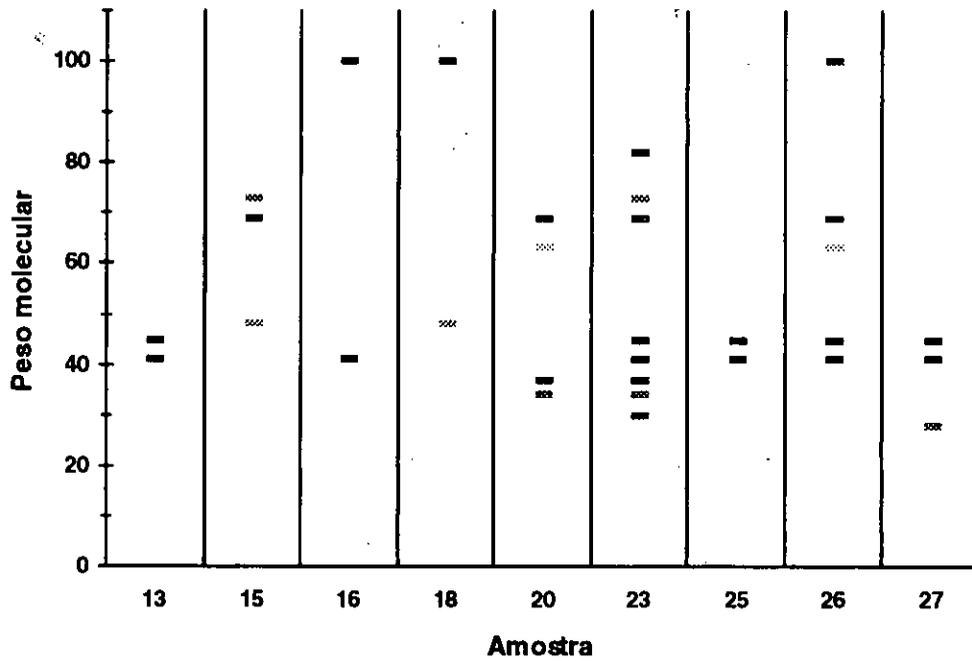


FIGURA 3 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-13

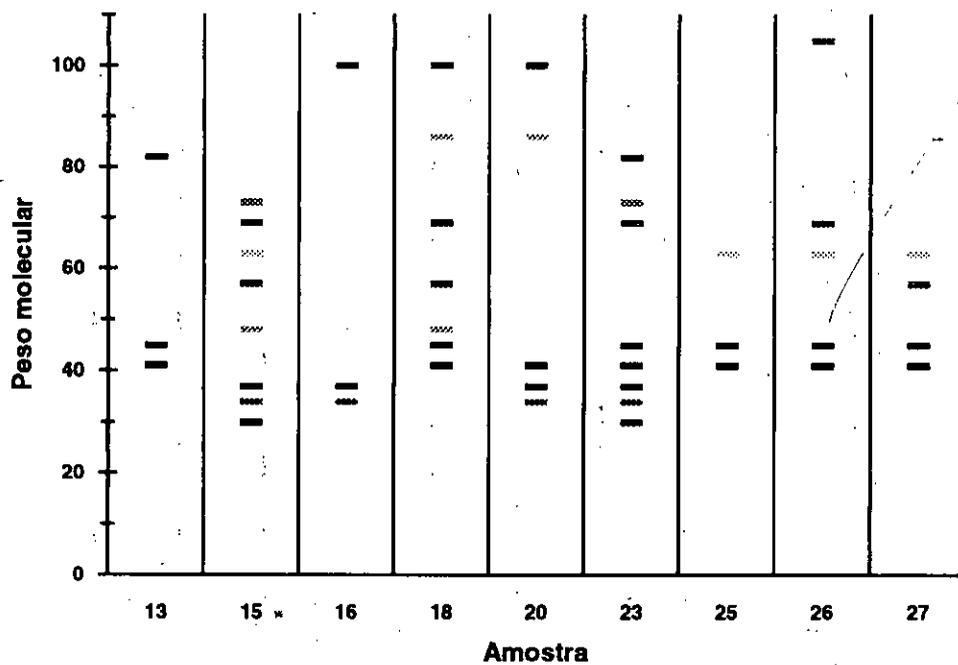


FIGURA 4 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-15

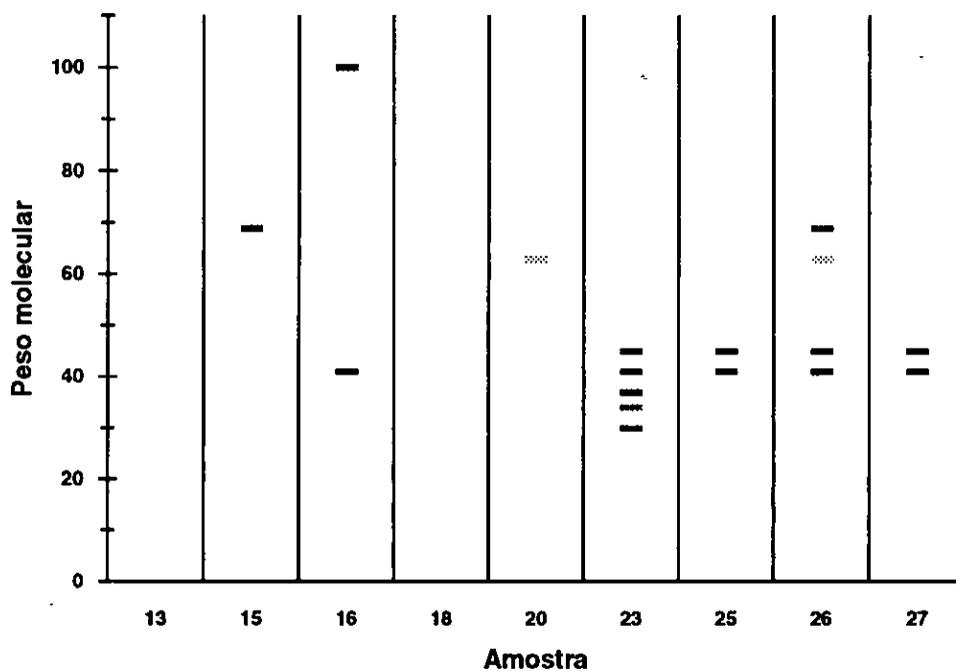


FIGURA 5 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-16

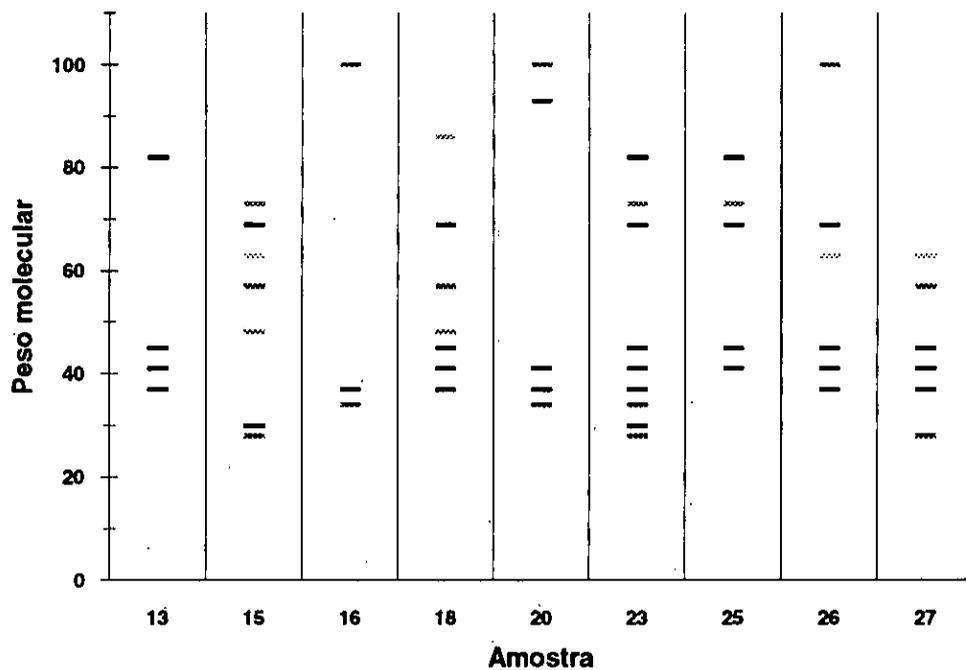


FIGURA 6 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-18

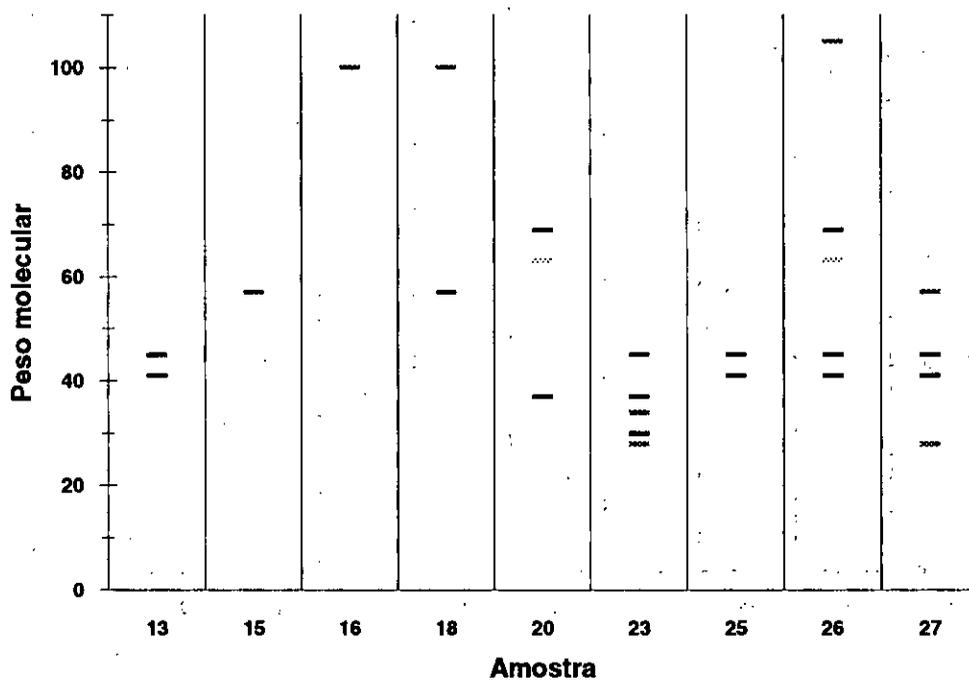


FIGURA 7 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-20

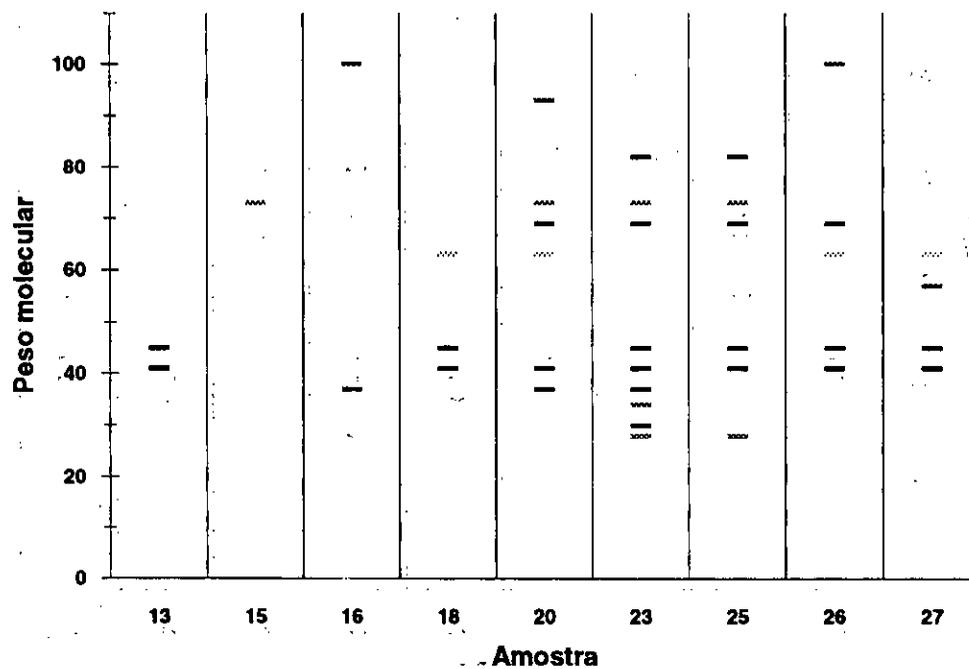


FIGURA 8 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-23

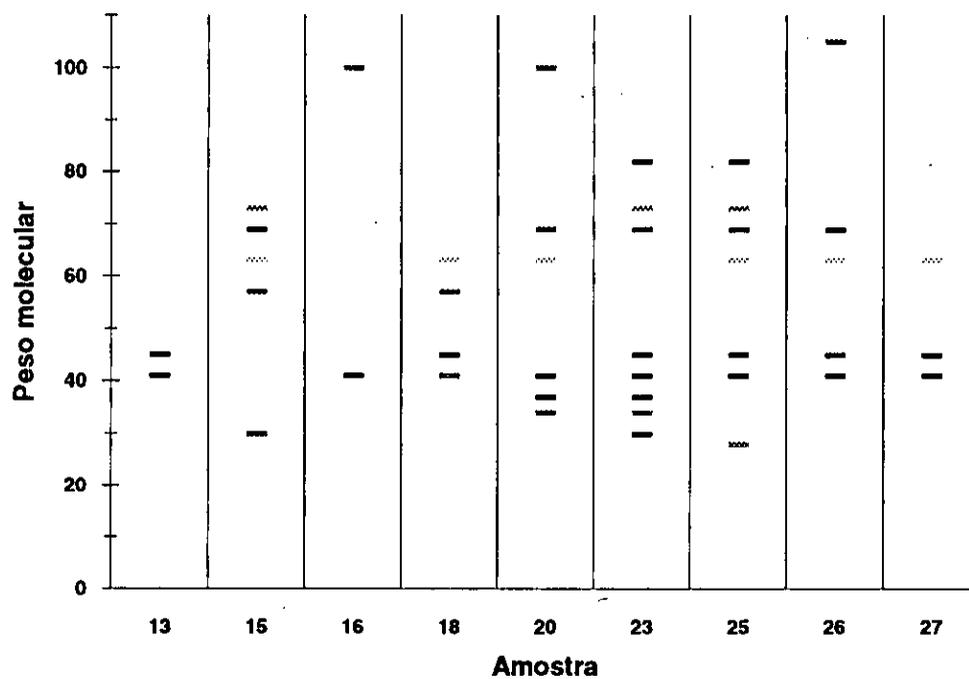


FIGURA 9 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-25

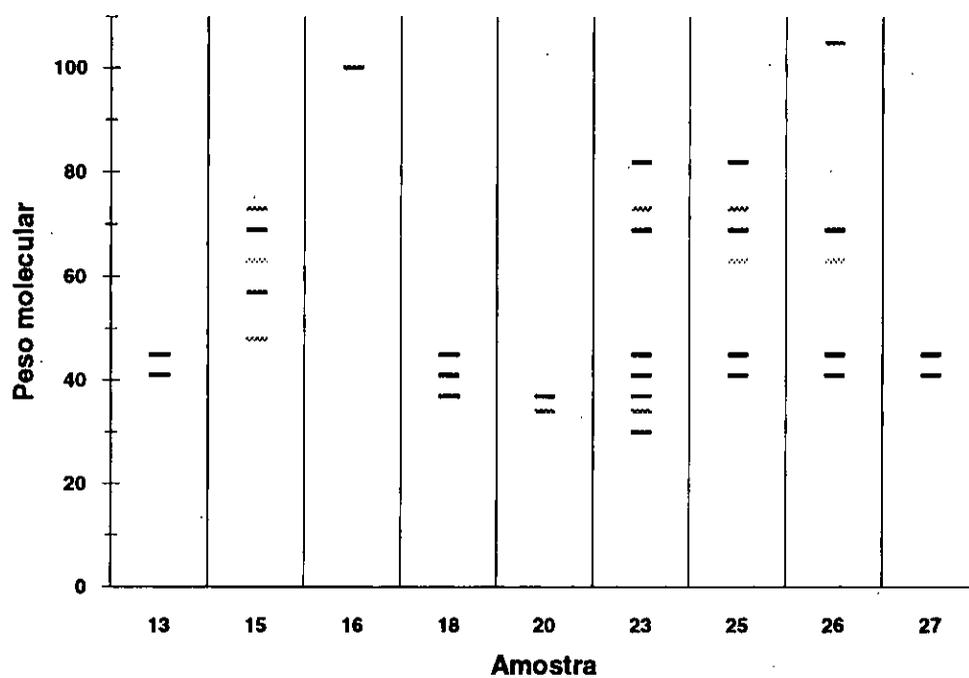


FIGURA 10 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-26

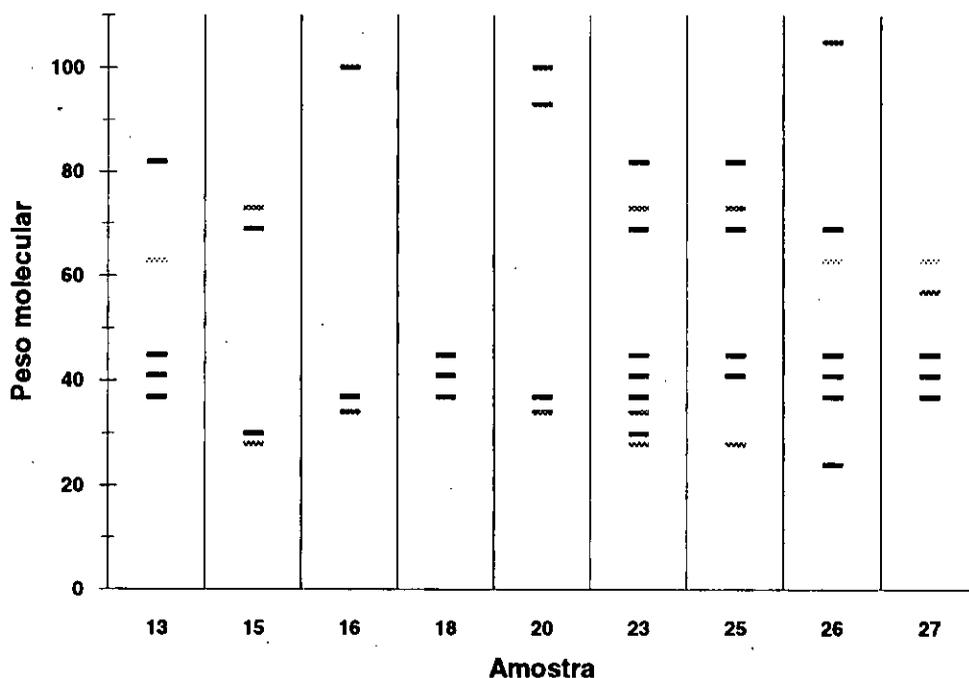


FIGURA 11 – Western blot: padrão de reconhecimento do soro anti-27

Na Tabela 2, estão representados os pesos moleculares das bandas que foram caracterizadas na prova de “western”, das amostras de campo. Verifica-se que os pesos moleculares encontrados para a VP1 são de 100 kDa, 93 kDa, 86 kDa, 73 kDa e 69 kDa. Já, nas proteínas VPX, VP2, VP3 e VP4, houve uma constância, aparecendo valores de 48 kDa, 37 kDa, 34 kDa e 28 kDa. Algumas bandas não foram detectadas nas amostras 13, 16, 18 e 20. A Tabela 3 mostra os pesos moleculares das bandas encontradas

nas amostras de vacinas, onde se verifica um perfil semelhante ao das amostras de campo, com diferenças apenas na VP1, onde os pesos moleculares encontrados são de 73 kDa, 69 kDa e 63 kDa e na VP4 da amostra 26, onde aparece um peso de 24 kDa. As demais proteínas são identificadas com os mesmos pesos moleculares encontrados nas amostras de campo. Nas Figuras de 3 a 11 aparecem, ainda, bandas com peso molecular de 57 kDa, que poderia ser um polipeptídeo precursor das VP2, VP3 e VP4.

TABELA 2 – Pesos moleculares das bandas de Proteínas Virais (VP) nas amostras de campo, determinadas por “Western Blotting”

Proteína viral	13	15	16	18	20
VP1	NA*	73/69**	100	100/86	100/93
VPX	NA	48	NA	48	NA
VP2	37	37	37	37	37
VP3	NA	34	34	NA	34
VP4	NA	28	NA	NA	NA

* Não apareceram bandas com este peso molecular

** Valores em kDa

TABELA 3 – Pesos moleculares das bandas de Proteínas Virais (VP) nas amostras de vacinas, determinadas por "Western Blotting"

Proteína Viral	23	25	26	27
VP1	73/69**	73/69	69	63
VPX	NA*	NA	NA	NA
VP2	37	NA	37	37
VP3	34	NA	NA	NA
VP4	28	28	24	28

* Não apareceram bandas com este peso molecular ** Valores em kDa

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise de cepas variantes do sorotipo 1 do VIBF tem se tornado mais importante nos últimos anos, devido ao aumento dos prejuízos econômicos causados por surtos da doença de Gumboro, em lotes de frangos vacinados com vacinas produzidas com a amostra clássica do sorotipo 1 do VIBF. Vários estudos têm sido realizados com este objetivo, empregando diferentes técnicas. Assim, JACKWOOD et al. (1985), utilizando a prova de vírus-neutralização, chegaram à conclusão de que 6 das 13 cepas analisadas no trabalho eram subtipos do sorotipo 1. Em 1988, BECHT et al. relataram diferenças estruturais na proteína viral VP2 entre os sorotipos 1 e 2 do vírus da DG.

Vários autores têm descrito o perfil das proteínas virais (VP) no sorotipo 1 do vírus da IBF, encontrando pesos moleculares diferentes para cada uma das quatro VP. DOBOS (1979), trabalhando com amostras purificadas do vírus da IBF encontrou as seguintes proteínas virais com seus respectivos pesos moleculares: VP1 (90 kDa), VP2 (41 kDa), VP3 (35 kDa), VP4 (28 kDa) e VPX (47 kDa). BECHT (1980), trabalhando com amostras de vírus altamente purificadas, encontrou pesos moleculares de 86 kDa (VP1), 48 kDa (VPX), 40 kDa (VP2), 32 kDa (VP3) e 28 kDa (VP4). A proteína viral 1 não foi plenamente identificada no "western" do sorotipo 1, com o peso molecular referido no trabalho de TODD e MCNULTY (1979), que encontraram valores de 97, 56 e 53 kDa, diferindo dos aqui encontrados, que foram 100, 73, 69, 63 e 57 kDa. Entretanto, nas provas com as amostras de campo e de vacina do presente experimento, aparece uma banda, com peso molecular de 86 kDa, que é referida no trabalho de BECHT (1980) como sendo a proteína viral VP1.

No experimento, foi encontrada uma proteína com peso molecular de 48 kDa, o que está de acordo com os resultados de TODD e MCNULTY (1979) e de BECHT (1980), e muito próximo do relatado por DOBOS (1979), que designou de VPX a proteína viral precursora da VP2, com peso molecular de 47 kDa. A proteína denominada de VP2, principal indutora de proteção ao hospedeiro

conforme AZAD et al. (1987) e BECHT et al. (1988), é descrita por vários autores com pesos moleculares entre 37 e 42 kDa. FAHEY et al. (1985) relacionaram o peso molecular de 37 kDa com a VP2. Já MÜLLER e BECHT (1982) encontraram para a mesma proteína um peso de 40 kDa. DOBOS (1979), comparando as proteínas do vírus da Infecção da Bolsa de Fabrício, relatou que a VP2 tinha um peso molecular de 41 kDa. JACKWOOD et al. (1985) diferiram dos outros autores, encontrando um peso molecular de 42 kDa para a proteína VP2. Nenhum dos pesos moleculares relatados acima apareceu no "western" da amostra padrão do presente experimento. No entanto, quando se analisam os "western" das Figuras 4 a 12, aparece uma banda com 37 kDa, concordando com o trabalho de FAHEY et al. (1985). O registro de um peso molecular de 30 kDa indicou a presença da proteína viral VP3, que é o mesmo encontrado por TODD e MCNULTY (1979), para esta proteína. A VP3 forma junto com a VP2, a quase totalidade do virion do vírus da doença de Gumboro, conforme trabalho de DOBOS (1979).

Quando as bandas são analisadas na Tabela 3, observa-se que os números encontrados são identificáveis com as proteínas virais relatadas por vários pesquisadores, conforme revisão feita por KIBENGE et al. (1988). Nas bandas detectadas nas amostras de campo verifica-se que a VP2, que é o polipeptídeo que contém o sítio responsável pela indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus da DIB (AZAD et al., 1987; BECHT et al., 1988) aparece em todas as amostras de campo com um peso molecular de 37 kDa, o mesmo valor referido por FAHEY et al. (1985). A VPX foi caracterizada apenas nas amostras 15 e 18 com um peso de 48 kDa, o mesmo que é relatado por MÜLLER e BECHT (1982). Nas amostras 13, 16 e 20 não foi detectada nenhuma banda com este peso molecular. Para a VP1 foram encontradas bandas com peso de 100 kDa, 93 kDa, 86 kDa, 73 kDa e 69 kDa, confundindo a sua identificação, mas dentro dos padrões de variação apresentados no trabalho de KIBENGE et al. (1988) onde a VP1 oscilou entre os valores de 51 kDa e 95 kDa. Apenas na amostra 18 aparece o peso de 86 kDa, relatado

por BECHT (1980) como sendo da VP1. A VP3, nas amostras 15, 16 e 20 apresentou peso molecular de 34 kDa, igual ao relatado por DOBOS (1979) e JACKWOOD et al. (1985). Na amostra 18 foi encontrada uma banda com peso de 28 kDa, o que caracteriza a VP4, de acordo com o trabalho de MÜLLER e BECHT (1982). Nas demais amostras esta banda não foi caracterizada. Quando se observa a Tabela 4, fica claro que o perfil das proteínas virais das amostras vacinais é semelhante ao das amostras de campo. Deve ser chamada a atenção principalmente para a proteína VP2, na qual se concentram as diferenças genéticas existentes entre variantes do sorotipo 1 da DIB (HUDSON et al., 1986). Esta banda aparece com um peso molecular de 37 kDa em todas as amostras, com exceção da amostra 25 que não revelou bandas nesta posição. A única proteína viral que não aparece em nenhuma amostra vacinal é a denominada de VPX (48 kDa). Nestas amostras a VP1 aparece com peso molecular de 73 kDa e 69 kDa, diferindo dos encontrados nas amostras de campo. A VP3 foi determinada apenas na amostra 23, com peso de 34 kDa. Já a VP4 aparece nas amostras 23, 25 e 27 com peso de 28 kDa e foi encontrada na amostra 26 com peso molecular de 24 kDa que é referido por TODD e MCNULTY (1979) também como sendo da VP4.

A análise das Figuras de 3 a 11, observa-se uma banda de 57 kDa que, conforme sugerido por HUDSON et al. (1986), pode ser um polipeptídeo precursor das proteínas VP2, VP3 e VP4. As diferenças nos pesos moleculares estimados podem ser devidas à metodologia empregada no experimento, de acordo com o trabalho de KIBENGE et al. (1988). Outra possível razão para estas variações pode ser a diferença na clivagem dos sítios das proteínas precursoras, quando diferentes sistemas são empregados na replicação viral. Assim, LANGE et al. (1987) e MÜLLER e BECHT (1982), relatam diferenças quando o vírus da DIB é replicado em cultura de tecidos ou diretamente na bolsa de Fabricio.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a opinião de SALLE (1989) que, ao avaliar a proteção conferida à progênie de matrizes vacinadas, constatou deficiências que atribuiu a falhas no programa de vacinação utilizado pelas empresas, bem como a existência de enfermidades intercorrentes. CHANG e HAMILTON (1982) estudaram a interação do vírus da DIB com a aflatoxina e concluíram que essa última aumentava significativamente a letalidade do vírus. A importância das conclusões acima referidas fica ainda maior ao se acrescentarem os dados de SALLE e WENDELSTEIN (1992) nos quais fica registrado que no período de 1985 a 1991, 15 a 29% das doenças diagnosticadas no sul do Brasil, eram de aflatoxicose.

Apesar do trabalho de LUNGE et al. (1997), ter caracterizado, com restrição enzimática (PCR) da proteína viral VP2, diferentes amostras do vírus da DIB no

campo, os resultados do presente experimento mostraram que as amostras trabalhadas de vírus da DIB, tanto de campo, quanto de vacina, diferentes das amostras trabalhadas por estes autores, não apresentaram variações antigênicas, quando se utilizou as provas de SDS-PAGE e "Western blotting". Com estes dados pode-se concluir, também, concordando com o trabalho de SALLE (1989), que as vacinas parecem ter condições de imunizar satisfatoriamente os animais e que os casos de DIB, nesta região do Brasil, devam-se mais a falhas nos programas de vacinação, título e tipo das vacinas utilizadas, e a doenças intercorrentes, do que a variações na estrutura antigênica do vírus de campo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AZAD, A.A.; JAGADISH, M.N.; BROWN, M.A.; HUDSON, P.J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a bimavirus. *Virology*, v. 161, p. 145-152, 1987.
- BECHT, H. Infectious bursal disease virus. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 90, p.107- 121, 1980.
- BECHT, H.; MÜLLER, H.; MÜLLER, H. K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *Journal General Virology*, London, v. 69, p. 631-640, 1988.
- BURNETTE, W. N. "Western Blotting": eletroforetic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, v. 112, p. 195-203, 1981.
- CHANG, C. F.; HAMILTON, P.B. Increased severity and new symptoms of infectious bursal disease during aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, v. 61, p. 1061-1068, 1982.
- DOBOS, P. Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, v. 32, n. 3, p. 1046-1050, 1979.
- FAHEY, K.; McWATERS, P.; BROWN, M.A.; MURPHY, V.J.; HEWISH, R. Virus - neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 35, p. 365-373, 1991.
- FAHEY, K.; O'DONNELL, I. J.; AZAD, A. A. Characterization by western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*, London, v. 66, p. 1479 - 1488, 1985.
- HUDSON, P. J.; MCKERN, N. M.; POWER, B. E.; AZAD, A. A. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Research*, v. 14, p. 5001-5012, 1986.
- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M. Characteristics and serologic studies of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Diseases*, Kennet Square, v. 26, n. 4, p. 871-872, 1982.
- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M. Diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 31, n. 4, p. 766-770, 1987.

- JACKWOOD, D. J.; SAIF, Y. M.; MOORDHEAD, P. D. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes and II in chickens. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 29, n. 4, p. 1184-1194, 1985.
- KIBENGE, F. S. B.; DHILLON, A. S.; RUSSEL, R. G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *Journal General Virology*, London, v. 69, p. 1757-1775, 1988.
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANGE, H.; MÜLLER, H.; KAEUFER, I.; BECHT, H. Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro. *Archives of Virology*, v. 92, p. 187-196, 1987.
- LUKERT, P. D.; SAIF, Y. M. Infectious bursal disease. In: CALNEK, B. W.; BARNES, J. H.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER Jr. H. W. (Eds.) *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, 1991, p. 648-663.
- LUNGE, V. R.; FONSECA A. S. R.; VERDI FILHO, R.; OLIVEIRA, C.; CHIARAMONTE, V. e IKUTA, N. Caracterização de genótipos de campo do vírus da doença de gumboro (IBDV) no Brasil. In: *Anais da Conferência APINCO 97 de Ciência e Tecnologia Avícolas*. São Paulo: APINCO, 1997, p.32.
- MÜLLER, H.; SCHOLTISSEK, C.; BECHT, H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal Virology*, v. 31, p. 584-589, 1979.
- MÜLLER, H.; BECHT, H. Biosynthesis of virus specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *Journal Virology*, v. 44, p. 384-392, 1982.
- ROSEMBERGER, J.K.; CLOUD, J. The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Diseases*, Kennett Square, v.33, p. 753-759, 1989.
- SALLE, C.T.P. Importância dos anticorpos maternos na doença de gumboro. *Avicultura e Suinocultura Industrial*, São Paulo, n.957, p.112-114, 1989.
- SALLE, C. T. P.; WENDELSTEIN, A. C. Situação da aflatoxicose no sul do Brasil. In: *CICLO DE CONFERÊNCIAS DA ASSOCIAÇÃO DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM AVICULTURA*, 3., 1992, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 1992. p. 43.
- SCHNITZLER, D.; BERNSTEIN, F.; MÜLLER, H.; BECHT, H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*, London, v. 74, p. 1563-1571, 1993.
- TODD, D.; McNULTY, M. S. Biochemical studies with infectious bursal disease virus: comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus. *Archives of Virology*, v. 60, p. 265-277, 1979.
- TURE, O.; SAIF, Y.M. Structural proteins of classic and variant strains of infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*, Kennett Square, v. 36, n. 4, p. 829-836, 1992.
- VILLEGAS, P. *Laboratory manual: avian virus diseases*. 2. ed. Athens: College of Veterinary Medicine, University of Georgia, 1981. p. 28-29.