

ESTOMATITE VESICULAR: MONITORAMENTO EM TOUROS DOADORES DE SÊMEN DE UMA CENTRAL DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

L.H. Okuda¹, J.A. Jerez², E.M. Pituco¹, E. De Stefano¹, L.A. Rodrigues³

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal, Instituto Biológico. Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: liriaho@uol.com.br

RESUMO

A Estomatite Vesicular (EV) constitui-se em uma das barreiras sanitárias impostas por países compradores de sêmen industrializado e envasado que exigem biossegurança, associado ao fato de ser zoonose. No presente trabalho foi monitorada uma Central de Inseminação Artificial (IA), localizada na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil, com o objetivo de detectar a presença de anticorpos para a EV (sorotipo Indiana) em touros doadores de sêmen. Foram examinados 72 touros no período de abril de 2000 a abril de 2001, totalizando três colheitas com intervalo semestral. A ocorrência encontrada foi: 1,4% (1/72) em abril de 2000; nenhum animal (0/40) em setembro de 2000 e 2,5% (1/40) em abril de 2001. Os animais positivos, mesmo não apresentando sintomas clínicos foram retirados do recinto. Apesar da eliminação do animal positivo na primeira avaliação, houve aparecimento de um novo caso em abril de 2001. Os resultados indicam a necessidade de monitoramento nas Centrais de IA no Brasil e sugerem a necessidade de se incrementar as medidas profiláticas de ordem inespecíficas para o controle da EV.

PALAVRAS-CHAVE: Estomatite Vesicular, soroneutralização, touros.

ABSTRACT

VESICULAR STOMATITIS: MONITORING IN SEMEN DONOR BULLS OF AN ARTIFICIAL INSEMINATION CENTER. Vesicular Stomatitis (VS) is a sanitary barrier imposed by countries that buy industrialized and bottled semen in order to assure biosafety, besides the disease is considered a zoonosis. In the present study an Artificial Insemination (AI) Center located in northeast São Paulo, Brazil, was monitored in order to detect the presence of antibodies to VS (Indiana serotype) in donor bulls. A total of 72 bulls were analyzed from 2000 April to 2001 April, in relation to three periods and the following occurrence was found: 1.4% (1/72) in 2000, April; all the bulls were negative in 2000, September and 2.5% (1/40) in 2001, April. Although positive animals did not present clinical symptoms, they were culled. Although the animal positive in the first evaluation was eliminated, there was a new case in April, 2001. Results indicate the need for surveillance at AI Centers in Brazil and suggest that prophylactic and unspecific measures for the control of VS should be improved.

KEY WORDS: Vesicular Stomatitis, serumneutralization test, bulls.

INTRODUÇÃO

A Estomatite Vesicular (EV) é causada por um *Vesiculovirus* pertencente à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Seu impacto econômico é observado pelas perdas que causa em animais enfermos, pelas restrições ao comércio internacional de animais e produtos de origem animal, pelo fato de ser zoonose e ainda ser clinicamente confundível com Febre Aftosa (ACHA & SZYFRES, 1986; REIF *et al.*, 1987;

QUIROZ *et al.*, 1988; LÓPEZ *et al.*, 1996-1997; INTERNATIONAL COMMITTEE TAXONOMY VIRUSES, 2001).

O risco de transmissão da EV pelo sêmen é pouco provável (AUVESTPLAN, 1996; AQIS, 1999), mesmo assim é necessário o monitoramento periódico por provas sorodiagnostics em touros doadores, com o objetivo de garantir ausência do vírus da EV por se tratar de uma doença pertencente a lista A do Código Sanitário Animal da OIE. Por definição as doenças assim classificadas acarretam graves consequências,

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP.

³Lagoa da Serra Holland Genetics.

principalmente, para o comércio internacional de sêmen e embriões bovinos, uma vez que se constitui um dos itens da barreira sanitária imposta por países compradores (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2001).

A Inseminação Artificial (IA) tornou-se metodologia fundamental para o melhoramento e diversificação genética dos rebanhos bovinos, entretanto, quando aplicada sem o controle sanitário adequado, constitui-se uma das vias de transmissão indireta de agentes patogênicos. Para garantir a qualidade sanitária do sêmen industrializado, as Centrais de IA têm adotado procedimentos tais como quarentena e monitoramento sorológico semestral dos touros doadores e controle de todas as partidas de sêmen que incluem isolamento de bactérias, protozoários e vírus (KAHRS *et al.*, 1980; LUCAS, 1986; AFSHAR & EAGLESOME, 1990).

Tendo em vista o potencial zoonótico do vírus da EV, a complexidade de fatores envolvidos nas vias de transmissão da infecção, a barreira sanitária imposta por países compradores, a necessidade de diagnóstico diferencial com a Febre Aftosa e a exigência de que o diagnóstico seja realizado apenas por laboratórios oficiais ou credenciados, levou-nos à realização do presente trabalho com o objetivo de monitorar uma Central de Inseminação Artificial para a detecção de anticorpos contra o vírus da Estomatite Vesicular (sorotipo Indiana) em touros doadores de sêmen.

MATERIAIS E MÉTODOS

Central de inseminação artificial

Foi monitorada uma Central de IA localizada na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil, cuja finalidade é a comercialização de sêmen em território nacional e para exportação. Esta Central integra um projeto do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico do Estado de São Paulo, que visa o controle sanitário de touros doadores e das partidas de sêmen para certificação da qualidade do produto comercializado.

A quarentena é realizada para admissão dos reprodutores na Central de IA, durante a qual são realizados exames clínicos e provas diagnósticas para brucelose, tuberculose, leptospirose, Herpesvírus bovino 1 (BHV-1), vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), vírus da Leucose Enzootica Bovina (BLEV) e Febre Aftosa (FMDV). Uma vez admitido, o touro é monitorado (sorodiagnóstico) semestralmente para BHV-1, BVDV, BLEV e FMDV. Atualmente, realiza-se também o controle de todas as partidas de sêmen para o BHV-1.

Amostras de soro

Foram monitorados 72 touros no período de abril de 2000 a abril de 2001, totalizando três

colheitas com intervalo semestral. Na primeira colheita realizada em abril de 2000, foram examinados 72 touros, seis meses após 40 touros e na última colheita, em abril de 2001, foram examinados 40 touros. Nem sempre o mesmo animal pôde ser submetido às três colheitas, pois dentro de uma Central de IA a população é dinâmica, novos touros são admitidos e os residentes podem ser retirados na dependência de vários fatores como estado sanitário para diversas enfermidades, desempenho reprodutivo ou ainda a finalização do seu contrato de permanência.

As amostras de soro foram colhidas asepticamente por punção da veia jugular em tubos Vacutainer. Após a retração do coágulo, em temperatura ambiente, a fração sérica de cada amostra foi transferida para frasco esterilizado, identificada convenientemente, inativada em banho-maria à temperatura de 56° C durante 30 minutos e congeladas à temperatura de -20° C até o momento do uso.

Reação de soroneutralização (SN)

A pesquisa de anticorpos neutralizantes foi realizada segundo procedimentos preconizados no Manual de Padrões para os Testes Diagnósticos e Vacinas do OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (1996).

Cada amostra de soro foi diluída em base 10 com meio de Eagle-MEM, com diluição inicial 1:5 e testada frente a 100 DICT_{50%}/50 µL do vírus padrão, Indiana 1 / Costa Rica 72, cujo título viral foi de 10^{5,6} DICT_{50%}/50 µL (REED & MÜENCH, 1938). Após o período de incubação em estufa a 37° C contendo 5% CO₂ por 1 hora, foi adicionado 50 µL de uma suspensão de células da linhagem VERO CCL-81 contendo 3 x 10⁵ células / mL. Em seguida as placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 48 horas. A leitura da prova foi realizada em microscópio óptico invertido. Para a prova ser considerada válida, os controles de células, a ausência de citotoxicidade do soro e o efeito citopático do vírus na placa controle tiveram que apresentar os resultados esperados. O título de anticorpos neutralizantes por amostra de soro foi definido como o inverso da maior diluição, variando de 10 a 640, que protegeu 100% da monocamada de células da linhagem VERO-CCL 81, frente a 100 DICT_{50%}/50 µL do vírus. Foram considerados positivos os animais que apresentaram título superior a 40.

RESULTADOS

O monitoramento para EV demonstrou animais não reagentes e animais com títulos de anticorpos

neutralizantes variando entre 10 e 320. Na primeira avaliação, das 72 amostras de soro analisadas, apenas o touro 27 (1,4%) foi considerado positivo, com título de anticorpos igual a 320 (Tabelas 1 e 2). Os demais animais, inclusive àqueles que apresentaram títulos menores que 40 foram considerados negativos (Fig. 1). O animal positivo e inclusive aqueles que apresentaram título de anticorpos igual a 40, ou seja, muito próximos do ponto de corte foram afastados da Central de IA.

No segundo exame, realizado no mês de setembro do ano 2000, todas as amostras foram consideradas negativas, por terem apresentado títulos de anticorpos iguais ou inferiores a 40 (Fig 1).

Na última avaliação, referente ao mês de abril de 2001, das 40 amostras de soro analisadas, apenas um touro (2,5%) apresentou-se positivo com título de anticorpos igual a 80, motivo pelo qual foi afastado da Central de IA (Tabelas 1 e 2, Fig 1). É importante salientar que este animal era negativo nas avaliações anteriores.

Durante o período estudado, nenhum dos animais apresentou sintomatologia clínica de EV, inclusive àquele que se tornou positivo na terceira avaliação.

DISCUSSÃO

O Brasil é considerado endêmico para a EV sorotipo Indiana, sendo que o sorotipo New Jersey ainda não foi assinalado (BRASIL, 1999; LOPEZ-INZAURRALDE *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Touros positivos para a Estomatite Vesicular, empregando a técnica da soroneutralização, segundo o período de colheita do soro para o monitoramento de uma Central de Inseminação Artificial, localizada na região nordeste do Estado de São Paulo. SP/2001.

Resultado	Meses		
	abril 2000	setembro 2001	abril 2001
Nº total de touros examinados	72	40	40
Nº total de touros positivos	1	0	1
Porcentagem	1,4 %	0%	2,5%

Tabela 2 – Título de anticorpos em touros positivos através da reação de soroneutralização para a Estomatite Vesicular, segundo o período de colheita de soro. SP/ 2001.

Touro	abril de 2000	setembro de 2001	abril de 2001
27	título = 320	descartado	descartado
42	não reagente	não reagente	título = 80

A importância da EV está relacionada ao seu controle, à necessidade de laboratórios que realizem o diagnóstico diferencial com outras doenças vesiculares, ao seu efeito adverso sobre a produtividade e à capacidade de infectar o homem (PEREZ & CORNELISSEN, 1988, HAYEK *et al.*, 1998).

No Estado de São Paulo, a EV foi relatada pela primeira vez por PUSTIGLIONE NETTO *et al.* (1967) e parece ainda estar presente, uma vez que recentemente DE STEFANO (2001) verificou 2,6% (28/1029) de animais reagentes, empregando, também, a soroneutralização em bovinos criados na região de Araçatuba.

Até o presente momento, nenhuma Central de IA havia se preocupado com o controle da EV. Esta situação iniciou-se com a barreira sanitária imposta pelos países compradores de sêmen e de embriões bovinos. Os resultados aqui apresentados demonstram a necessidade de monitoramento de touros em Centrais de IA. A primeira avaliação, realizada em abril de 2000, revelou que o touro 27 foi positivo e que, apesar do afastamento desse animal e de não terem sido encontrados indivíduos positivos na segunda avaliação (setembro de 2000), houve o aparecimento de um novo caso em abril de 2001, referente ao touro 42, que era negativo nas duas avaliações anteriores.

A reação de SN possui elevada especificidade e o antígeno aqui empregado foi uma amostra padrão de referência do sorotipo Indiana, por esse motivo descartou-se a possibilidade de reação inespecífica. Além disso, a partir de 1996, a OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES passou a adotar como ponto de corte, títulos superiores a 40.

É importante salientar que, no período estudado, nenhum dos animais com anticorpos para EV apresentaram sintomatologia clínica da doença, o qual também foi observado por DE STEFANO (2001) que verificou a ocorrência da EV em bovinos de corte, criados na região de Araçatuba, Estado de São Paulo. Segundo VANLEEUWEN *et al.* (1995), apenas 10 a 15% dos animais apresentam sintomatologia da doença em rebanho acometido.

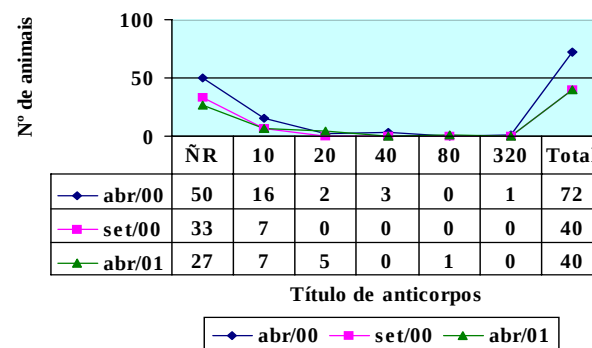


Fig. 1- Título de anticorpos soroneutralizantes para a Estomatite Vesicular, segundo o período de colheita, em touros de uma Central de Inseminação Artificial, localizada na região nordeste do Estado de São Paulo. SP/ 2001.

Um outro aspecto a ser considerado é o papel de indivíduos portadores de EV. Foi demonstrado, pela técnica de RT-PCR, em amostras de tecidos de bovinos inoculados experimentalmente, bem como em bovinos, suínos e eqüinos naturalmente infectados, a presença do gene L do sorotipo New Jersey do vírus da EV. Desta forma, é importante o descarte de animais soropositivos, uma vez que poderão se constituir em fonte de infecção (LETCHWORTH *et al.*, 1996; VILLALOBOS *et al.*, 2000).

Como os mecanismos de transmissão da EV não estão suficientemente esclarecidos, fica difícil determinar a via de transmissão responsável pela manutenção do vírus da EV na Central de IA em apreço. Essa realiza um rígido Programa Sanitário que incluem vários itens como quarentena, isolamento, controle de trânsito de animais, pedilúvio, rodolúvio, é proibido o ingresso de eqüinos no local e, principalmente, não existem propriedades vizinhas criadoras de bovinos, sendo circundada por canavial. Assim, o fato de terem sido encontrados animais positivos nos monitoramentos realizados em abril de 2000 e abril de 2001 sugerem a participação de vetores, uma vez que se trata do final do período chuvoso, no qual se verifica maior concentração de vetores e, conseqüentemente, maior disseminação da doença, tal como verificaram ORREGO *et al.* (1987), PEREZ & CORNELISSIEN (1988) e VILLALOBOS *et al.* (2001). Outro fator que nos leva a reforçar a validade dessa hipótese é que no monitoramento de setembro de 2000, não foi encontrado nenhum animal positivo.

Vale ressaltar que, no decorrer do tempo, as Centrais de IA foram se conscientizando da importância de se garantir a sanidade dos reprodutores; há muitos anos realizam exames para brucelose, tuberculose, leptospirose, tricomose e campilobacteriose. Com a exigência do mercado internacional, outros exames foram incorporados tais como BHV-1, BVDV, BLEV e FMDV. No caso de exportação do reprodutor ou do sêmen também é exigido o exame para BTV. Portanto, cada vez mais critérios de controle rigorosos são exigidos, com o objetivo de garantir a ausência de microorganismos patogênicos no sêmen, reduzindo assim, o risco de transmissão para fêmeas e seus descendentes.

No caso da EV, a transmissão do vírus por meio do sêmen parece pouco provável (AUSVETPLAN, 1996; AQIS, 1999) e no embrião é baixo, da ordem de 1 em 100 milhões (10^{-8}) de conformidade com SUTMÖLLER & WRATHALL (1997), no entanto constitui-se em uma barreira sanitária imposta por países compradores (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2001), razão pela qual nenhuma Central de IA conseguirá obter certificado negativo sem o monitoramento adequado.

Apesar dos esforços empreendidos para o monitoramento da EV, a complexidade de fatores (ou

de elementos) envolvidos nas vias de transmissão indireta do agente etiológico contribuiu para o aparecimento de um animal positivo. Doravante, será necessário que sejam incrementadas outras medidas profiláticas de ordem inespecíficas para se obter maior sucesso no controle da infecção pelo vírus da EV nas Centrais de IA.

CONCLUSÕES

O presente trabalho detectou a presença de anticorpos para o vírus da EV (sorotipo Indiana) em touros doadores de sêmen de uma Central de IA no Estado de São Paulo.

Os animais positivos não apresentaram sintomatologia clínica da EV.

Mesmo com a eliminação do animal positivo na primeira avaliação, houve aparecimento de um novo caso na terceira avaliação.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de monitoramento sorológico da EV em Centrais de IA no Estado de São Paulo.

Além do monitoramento sorológico, há necessidade de incrementar medidas profiláticas de ordem inespecíficas para se obter melhor sucesso no controle da EV em Centrais de IA no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. 2. ed. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud, 1986. (OPAS – Publicación Científica, 503).
- AFSHAR, A. & EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull.*, v.60, n.2, p.93-109, 1990.
- AUSVETPLAN. Disease Strategy. Vesicular Stomatitis. Electronic version 2.0. p.1-32, 1996. Disponível em: <<http://www.aahc.com.au/ausvetplan/vsvfinal.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2001.
- AQIS. Import risk report on the importation of bovine semen and embryos of the Argentina and Brazil into Australia. Part 1. Electronic version 2.0, p.1-77, 1999. Disponível em: <<http://www.aahc.com.au/status/ahiareport/2001/ie-imports.html>>. Acesso em: 20 out. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Protocolo de intenções referente aos requisitos sanitários exigidos para a comercialização de bovinos, embriões de bovino e sêmen bovino, entre a República Federativa do Brasil e a República da Colômbia [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <liriaho@uol.com.br>. Acesso em: março. 2000.
- DE ANDA, J.H.; SALMAN, M.D.; MASON, J.; KEEFE, T.J.; WEBB, P.A.; REIF, J.S.; AKKINA, R. A prospective study of vesicular stomatitis in cattle in an enzootic region of Mexico. *Prev. Vet. Med.*, v.14, n.34, p.209-215, 1992.

- DE STEFANO, E. *Avaliação sorológica preliminar da Estomatite Vesicular em bovinos de corte criados na micro-região de General Salgado, Estado de São Paulo*. São Paulo: 2001. 51p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].
- HAYEK, A.M.; MCCLUSKEY, B.J.; CHAVEZ, G.T.; SALMAN, M.D. Financial impact of the 1995 outbreak of vesicular stomatitis on 16 beef ranches in Colorado. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.212, n.6, p.820-823, 1998.
- INTERNATIONAL COMMITTEE TAXONOMY VIRUSES Rhabdoviridae. In: *Virus Taxonomy and Classification. Index of Viruses*. Disponível em: <http://www.life.bio2.columbia.edu/Ictv/ICTV_2001a300.html>. Acesso em: 24 nov. 2001.
- KAHRS, R.F.; GIBBS, E.P.J.; LARSEN, R.E. The search for viruses in bovine semen, a Review. *Theriogenology*, v.14, p.151-165, 1980.
- LETCHWORTH, G.J.; BARRERA, J.D.C.; FISHEL, J.R.; RODRIGUEZ, L.L. Vesicular Stomatitis New Jersey virus RNA persists in cattle following convalescence. *Virology*, v.219, n.2, p.480-484, 1996.
- LOPEZ-INZAURRALDE, A.; MOREIRA, E.C.; LÓPEZ, J.W.; SÖNDAHL, M.S. Distribución Histórica De la Estomatitis Vesicular en Brasil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, v.62/63, p.10-20, 1996/1997.
- LUCAS, M.H. Control of virus disease in bulls in Artificial Insemination Centres in Britain. *Vet. Rec.*, v.119, n.1, p.15-16, 1986.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. VESICULAR STOMATITIS. In: *Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biologic products*. Paris: OIE, 1996, p.57-63.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Vesicular Stomatitis. In: *Internacional Animal Health Code*. Paris: OIE, 2001. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mcode/E_00029.htm>. Acesso em: 20 ago. 2001.
- ORREGO, A.; ARBELÁEZ, G.; ROCHA, J. Avances en las investigaciones sobre la estomatitis vesicular en Colombia. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario, 1987, 56 p.
- PEREZ, E. & CORNELISSEN, B. Retrospective study of the temporal distribution of vesicular stomatitis in cattle in Costa Rica, 1972-1986. *Prev. Vet. Med.*, v.6, n.1, p.1-8, 1988.
- PUSTIGLIONE NETTO, L.; PINTO, A. A.; SUGA, O. Isolamento do vírus, identificação sorológica e levantamento epizootiológico de um surto de Estomatite Vesicular no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.34, n.2, p.69-72, 1967.
- QUIROZ, E.; MORENO, N.; PERALTA, P.H.; TESH, R.B. A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.39, n.3, p.312-314, 1988.
- REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, n.3, p.493-497, 1938.
- REIF, J.S.; WEBB, P.A.; MONATH, T.; EMERSON, J.K.; POLAND, J.D.; KEMP, G.E. Epizootic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: infection in occupational risk groups. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.36, n.1, p.177-182, 1987.
- SUTMÖLLER, P. & WRATHALL, A.E. A quantitative assessment of the risk of transmission of foot-mouth-disease, bluetongue and vesicular stomatitis by embryo transfer in cattle. *Prev. Vet. Med.*, v.32, n.1-2, p.111-132, 1997.
- VERNON, S.D.; RODRIGUEZ, L.L.; LETCHWORTH, G.J. Vesicular Stomatitis New Jersey virus glicoprotein gene sequence and neutralizing epitope stability in an enzootic focus. *Virology*, n.1, 177, p.209-215, 1990.
- VILLALOBOS, R.; BARRERA, J. C.; VILLAMIL, L.C. Persistencia de los virus de la Estomatite Vesicular New Jersey e Indiana en bovinos, equinos y porcinos naturalmente infectados. Memórias. In: II Conferencia Internacional sobre la Estomatitis Vesicular y su impacto sobre la producción pecuaria americana, disponível em: <http://www.panaftosa.org.br/novo/Estomatitis/Mem/Memorias/Jose_Bar.../VILL-UN.html> Acesso em: 3.set. 2001.

Recebido em 30/9/02
Aceito em 5/3/03