

# FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL

R.R. Pinheiro<sup>1</sup>, T.S. Souza<sup>2\*</sup>, A.L.V.L. Feitosa<sup>3</sup>, M.A.C. Aragão<sup>4</sup>,  
C.C.V. Lima<sup>2\*</sup>, J.N. Costa<sup>5</sup>, A. Andrioli<sup>1</sup>, M.F.S. Teixeira<sup>3</sup>, R.L.L. Brito<sup>6\*\*</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, CP145, CEP 62010-970, Sobral, CE, Brasil. E-mail: rizaldo.pinheiro@embrapa.br

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de ovinos soropositivos para o vírus da língua azul (VLA) no Estado do Ceará, Brasil, e analisar as proteínas imunogênicas das cepas virais circulantes nesses rebanhos. O teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) foi utilizado para pesquisar 271 amostras de soro oriundas de 16 rebanhos. Os resultados demonstraram que 27,3% (74/271) das amostras analisadas apresentaram anticorpos contra o agente e 68,8% (11/16) das propriedades tiveram animais positivos. O *immunoblotting* (IB) foi utilizado para analisar as proteínas imunogênicas do VLA a partir dos soros de animais positivos no IDGA. Os soros demonstraram forte reação contra a proteína viral VP2. Para o VLA, das sete proteínas estruturais, a VP2 é a principal a estimular a resposta imune protetora. Concluiu-se que a soropositividade para a língua azul (LA) nos rebanhos ovinos estudados no Ceará é alta, apesar dos animais não apresentarem sinais clínicos, indicativo de que o vírus ocorra de forma endêmica. Além disso, a resistência à doença apresentada pelos animais pode estar relacionada com a forte reação imunológica desses à proteína VP2. Sendo assim, outros estudos são necessários para melhor esclarecer a situação epidemiológica da LA no país, através da identificação dos vetores e sorotipos virais circulantes nas diferentes regiões.

PALAVRAS-CHAVE: *Orbivirus*, ruminantes, semiárido, VP2.

## ABSTRACT

ANTIBODIES AGAINST THE BLUETONGUE VIRUS IN SHEEP FLOCKS OF CEARÁ STATE, BRAZIL. The objective of this work was to verify the occurrence of sheep serologically positive for bluetongue virus (BTV) in the state of Ceará, Brazil, and analyze immunogenic proteins of circulating viral strains in these flocks. The agar gel immunodiffusion test (AGID) was used to examine 271 serum samples from 16 herds. The results demonstrated that 27.3% (74/271) of the analyzed samples presented antibodies for the agent, and that 68.8% (11/16) of the properties presented positive animals. Immunoblotting (IB) was used to analyze the immunogenic proteins of BTV derived from AGID positive sera. Sera showed strong reaction against viral protein VP2. Of the seven BTV structural proteins, VP2 is the major protein to elicit protective immune responses. It was concluded that bluetongue (BT) seropositivity in sheep flocks studied in Ceará is high, despite that the animal's do not show clinical signs, indicating that it occurs in an endemic form. The animals' resistance to the disease may be related to the strong immune response to the protein VP2. Therefore, further studies are needed to better clarify the epidemiological situation of BT in Brazilian sheep flocks, through the identification of viral vectors and serotypes circulating in different regions.

KEY WORDS: *Orbivirus*, ruminants, semiarid, VP2.

---

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Virologia, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Departamento de Biologia, Sobral, CE, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Cruz das Almas, BA, Brasil.

<sup>6</sup>Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

\*Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos.

\*\*Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

## INTRODUÇÃO

A língua azul (LA) é uma enfermidade viral transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Culicoides* sp., capaz de acometer todas as espécies de ruminantes domésticos e selvagens, apesar da doença ter sido demonstrada principalmente em ovinos (COSTA *et al.*, 2006; BATTEN *et al.*, 2008; WILSON *et al.*, 2008). É de notificação compulsória à Organização Mundial de Saúde Animal, cujo impacto econômico decorre das perdas diretas nos rebanhos afetados e também das restrições econômicas impostas por países importadores (OIE, 2008).

O vírus da língua azul (VLA) é membro do gênero *Orbivirus* e da família *Reoviridae* e 25 sorotipos já foram identificados em diversos países (HOFMANN *et al.*, 2008; CHAIGNAT *et al.*, 2009). A partícula viral não é envelopada e possui aproximadamente 70 nm de diâmetro, compreendendo o genoma de dez segmentos de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA), circundado por três camadas proteicas concêntricas que formam o capsídeo. A camada interna é constituída pela proteína viral "3" (VP3) e contém três enzimas na superfície interna (VP1, VP4 e VP6). A camada média é composta por VP7, que possui grupos antigênicos. VP2 e VP5 formam a camada externa. VP2 contém a maioria dos antígenos neutralizadores virais, tendo uma sequência variável entre os diferentes sorotipos (CHAGAS; PINHEIRO, 2003; BATTEN *et al.*, 2008; SCHWARTZ-CORNIL *et al.*, 2008; ROY *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos da enfermidade incluem anorexia, febre, apatia e sialorreia; edema, hiperemia, lesões e crostas nas mucosas, narinas, lábios, língua, tetos, coroa dos cascos e interdígitos; hipersensibilidade da pele, marcha rígida e paresia (BALDWIN *et al.*, 1991; CLAVIJO *et al.*, 2002; ELBERS *et al.*, 2008), além de transtornos reprodutivos como abortamentos, natimortos, malformações, nascimento de animais fracos e infertilidade (LOBATO, 1999).

Apesar dos primeiros relatos dessa enfermidade só terem sido publicados no final do século XIX e início do século XX, a LA foi inicialmente descrita

por fazendeiros na África do Sul como "febre catarral ovina" e causou sérios transtornos, sendo observada após a importação de ovinos da raça Merino da Europa, no final do século XVIII. A denominação "bluetongue" mais tarde foi utilizada para descrever a cianose da língua de ovinos severamente afetados (MACLACHLAN, 2004; VELLEMA, 2008).

A primeira epizootia de LA fora da África ocorreu em ovinos no Chipre, em 1943. Em 1956, um surto na Península Ibérica resultou na morte de quase 180.000 ovinos (VELLEMA, 2008). No entanto, a maior epizootia já registrada da doença se iniciou em 1998, na bacia do Mediterrâneo, quando o VLA-9 foi detectado nas ilhas gregas de Rhodos, Kos, Samos e Lesbos. Nos anos subsequentes, o vírus se disseminou para o norte e oeste europeu. Outros sorotipos também entraram na Europa pelo leste e então se disseminaram para o oeste, causando a morte de milhares de ovinos (MELLOR; WITTMANN, 2002; PURSE *et al.*, 2005).

A distribuição mundial do VLA não é um evento recente e diferentes sorotipos e cepas estão envolvidos, coincidindo com a presença de distintas espécies de *Culicoides* (MACLACHLAN, 2004). Em muitas regiões tropicais e subtropicais, o vírus está amplamente disseminado, apesar de a enfermidade ser rara ou inexistente (LOBATO, 1999). No Brasil, de acordo com levantamentos sorológicos realizados em vários estados, o VLA se difunde de forma silenciosa (CHAGAS; PINHEIRO, 2003; TOMICH *et al.*, 2006).

Nesse contexto, considerando a escassez de dados referentes à ocorrência de LA em rebanhos ovinos no Estado do Ceará, este trabalho teve por objetivo avaliar a frequência de animais soropositivos no estado, bem como verificar as proteínas imunogênicas da cepa viral circulante nesses rebanhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido a partir de amostras de soro de ovinos colhidas em municípios pertencentes a quatro mesorregiões do Estado do Ceará, no período de outubro de 2005 a dezembro de 2006 (Tabela 1).

Tabela 1 - Mesorregiões, municípios e número de propriedades visitadas para avaliação da ocorrência de anticorpos contra o vírus da língua azul no Estado do Ceará.

Mesorregiões	Municípios	Nº de propriedades	Nº de animais
Sertões Cearenses	Quixadá	2	25
	Tauá	4	34
Jaguaribe	Jaguaribe	1	16
Centro-Sul Cearense	Várzea Alegre	1	26
	Massapê	1	8
Noroeste Cearense	Sobral	6	142
	Granja	1	20
Total		16	271

A amostragem foi calculada através da fórmula de ASTUDILLO (1979), assumindo-se um erro amostral de 20%, grau de confiança de 95% ( $z = 1,96$ ), levando-se em consideração a prevalência estimada de 30,6% (SILVA, 2002). Sendo assim, o número mínimo de amostras a serem colhidas foi de 218. No entanto, 271 ovinos foram utilizados para as coletas, por amostragem não probabilística. O número de animais por propriedade foi o equivalente a 10% do total do rebanho, resultando em 16 propriedades visitadas.

A idade dos animais foi estimada com base na arcada dentária, sendo utilizados na pesquisa aqueles com mais de seis meses de idade. Os animais foram avaliados clinicamente, buscando-se alterações características da LA, segundo CLAVIJO *et al.* (2002) e ELBERS *et al.* (2008). Após a antisepsia com álcool iodado, colheram-se as amostras de sangue através da punção da veia jugular, utilizando-se tubos estéreis a vácuo, sem anticoagulante. Em seguida, após a formação de coágulo, os tubos foram centrifugados a 1.500 g por 10 minutos para a obtenção dos soros, que foram acondicionados em tubos tipo *ependorfe* e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes sorológicos.

A sorologia para a detecção de anticorpos contra o VLA foi realizada pelo método de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), utilizando-se o kit comercial da *Veterinary Medical Research and Development* (VMRD). Preparou-se o gel de ágar por suspensão de agarose a 0,9% com solução a 0,85% de cloreto de sódio em água Milli-Q, sob aquecimento de banho-maria. Posteriormente, à temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ , a solução foi distribuída em placas de Petri. Após a polimerização adequada sob refrigeração, o gel foi perfurado com roseta metálica contendo sete poços, um no centro e seis periféricos em formato hexagonal. Utilizaram-se 20  $\mu\text{L}$  de antígeno no poço central e 20  $\mu\text{L}$  de soro padrão e soros testes nos poços periféricos de forma intercalada. As placas foram incubadas em câmara úmida à temperatura entre 22 e  $25^{\circ}\text{C}$ .

Realizaram-se leituras após 24 e 48 horas de incubação, utilizando-se feixe de luz intenso, sobre fundo escuro, para observação de linhas de precipitação. O soro teste foi considerado positivo quando houve a formação de linha de precipitação com identidade com as linhas de referência do soro padrão positivo ou quando estas linhas de referência se desviaram em direção ao poço contendo o soro teste, seguindo-se as recomendações do fabricante do kit comercial.

Com base nos resultados sorológicos, foram calculadas as frequências para as variáveis sexo, faixa etária e tipo racial. Objetivando-se verificar a existência de diferenças significativas, utilizou-se o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com o auxílio do programa EPI-INFO (DEAN *et al.*, 1994).

Para avaliação das proteínas imunogênicas da cepa circulante no Estado do Ceará, realizou-se a dosagem proteica do antígeno do kit (BRADFORD, 1976).

Em seguida, o antígeno foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando-se minigel (Mini-Protean II Cell® - Bio-Rad) formado por gel de concentração e gel de separação, acompanhado com padrão (LAEMMI, 1970). Determinou-se o perfil eletroforético do antígeno diluído em tampão de amostra, na proporção de 1:1, utilizando-se 8  $\mu\text{L}$  de antígeno e 8  $\mu\text{L}$  de tampão da amostra, aquecendo-se a mistura a  $100^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos (HARLON; LANE, 1988).

Procedeu-se com a técnica de *immunoblotting* (IB), com transferência das proteínas do antígeno, do gel para a membrana de nitrocelulose (MN), através do trans-blot (Trans-blot® Bio-Rad) em tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (tampão fosfato salino - PBS, com 0,3% de Tween 20) por 60 minutos e lavada com solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) por três vezes. Incubou-se a MN com soros dos animais positivos no teste de IDGA, utilizando-se como controle positivo o soro padrão do kit da VMRD, na diluição de 1:200, em PBS. Em seguida, a membrana foi novamente lavada três vezes e incubada com conjugado anti-IgG ovino marcado com peroxidase, na diluição de 1:1000 em PBS, por 60 minutos. Após lavagens, a MN foi colocada em solução de revelação com peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com lavagem em água Milli-Q (ARAGÃO *et al.*, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 271 amostras de soro de ovinos oriundas de 16 propriedades do Estado do Ceará, utilizando-se a técnica de IDGA, sendo que 27,3% (74/271) dos animais apresentaram anticorpos contra o VLA (Tabela 2) e 68,8% (11/16) das propriedades possuíram pelo menos um animal soropositivo. Não foram observados sinais clínicos da enfermidade nos animais amostrados.

Tabela 2 - Ocorrência de soropositividade para o vírus da língua azul, em rebanhos ovinos de municípios do Estado do Ceará, 2012.

Municípios	Nº de amostras colhidas	Nº de positivos	Ocorrência (%)
Massapê	8	0	0
Sobral	142	53	37,3
Tauá	34	3	8,8
Várzea Alegre	26	2	7,7
Quixadá	25	0	0
Granja	20	16	80
Jaguaribe	16	0	0
Total	271	74	27,3

O VLA ocorre em uma ampla faixa que abrange grande parte das Américas, África do Sul, Ásia, norte da Austrália e Europa (MELLOR; WITTMANN, 2002). Acredita-se que o vírus exista em ecossistemas, onde as cepas virais específicas provavelmente co-evoluíram com diferentes espécies do inseto vetor (MACLACHLAN, 2004).

Entretanto, existe uma questão epidemiológica muito importante que diz respeito à distribuição do vírus em diferentes zonas. Em zonas epidêmicas, o número de animais com anticorpos contra a doença varia e geralmente é focal. Assim, surtos esporádicos podem ocorrer. Em zonas incursivas, animais soropositivos são raros, assim como o aparecimento da doença. Já em zonas endêmicas, a infecção é comum, mas a enfermidade é rara ou inexistente (LOBATO, 1999).

Na América do Sul, raças localmente adaptadas de ovinos são suspeitas de possuírem alta prevalência de anticorpos, mas aparentarem resistência à LA, apesar de múltiplos sorotipos de VLA poderem estar circulando (CLAVIJO *et al.*, 2002). Isso ocorre devido às condições de temperatura e umidade de países tropicais, que favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores do vírus, mantendo-o endemicamente, com grande parte da população de ruminantes imune aos sorotipos presentes na área (CHAGAS; PINHEIRO, 2003; TOMICH *et al.*, 2006).

Sendo assim, os resultados sugerem que o vírus é endêmico nas regiões cearenses estudadas, justificando a alta ocorrência de anticorpos anti-VLA frente à ausência de sinais clínicos nos animais avaliados e de relatos de surtos da enfermidade.

De acordo com LOBATO (1999) e COSTA *et al.* (2006), a primeira indicação da presença do VLA no Brasil foi relatada em 1978, com a demonstração de anticorpos anti-VLA em bovinos e em ovinos de propriedades do Estado de São Paulo. Observando-se os dados obtidos por sorologia em diferentes regiões do país (Tabela 3), tudo indica que o vírus se dissemina pelos rebanhos de forma silenciosa, apesar de dois surtos de LA já terem sido relatados no Brasil, um no Rio

de Janeiro, em 1998 (FIGUEIREDO *et al.*, 2007) e o outro no Paraná, em 2002 (CLAVIJO *et al.*, 2002), afetando caprinos e ovinos.

Entretanto, deve-se ressaltar que os inquéritos sorológicos realizados no Brasil demonstram uma grande diversidade de resultados, com alguns estudos apontando para uma baixa frequência de soropositivos e outros alertando para a ampla disseminação do VLA em determinadas áreas. Isso sugere que o vírus não se distribui uniformemente pelas diferentes regiões do país, o que pode estar relacionado a fatores climáticos, dentre outras variáveis.

Os fatores climáticos desempenham um papel importante na infecção e transmissão do vírus, principalmente por interferir na sobrevivência dos vetores (MELLOR *et al.*, 2000; LAGER 2004; MACLACHLAN, 2004). O surgimento da população de *Culicoides* tende a ser ótimo com temperatura variando de 25 a 30°C e é inibido com temperatura abaixo de 8 a 10°C (PURSE *et al.*, 2005). Além disso, no período de chuvas, quando a temperatura e a umidade estão elevadas, há o favorecimento da multiplicação e manutenção dos vetores, levando ao aumento da porcentagem de animais soropositivos (CLAVIJO *et al.*, 2002; KONRAD *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2006).

No sertão da Paraíba, MELO *et al.* (2000) detectaram baixa ocorrência de animais positivos. Na Bahia, SOUZA *et al.* (2010) também observaram prevalência muito baixa em região com tipologia climática árida e semiárida, com predominância de sistemas de criação extensivos. A temperatura e a umidade do semiárido podem dificultar a sobrevivência do *Culicoides* sp., justificando a baixa frequência de soropositivos (MELO *et al.*, 2000).

No entanto, neste trabalho observou-se alta frequência de animais soropositivos. O Ceará possui a maior parte do seu território no clima semiárido, com período chuvoso se restringindo em 3 ou 4 meses do ano (normalmente de fevereiro a maio). Os municípios estudados (Tabela 4) estão localizados em uma faixa de temperatura média anual que varia de 26 a 28°C (FUNDAÇÃO..., 2011).

Tabela 3 - Frequência de soropositividade obtida pelo teste de imunodifusão em gel de agarose, para o vírus da língua azul, em diferentes regiões brasileiras.

Estado	Espécie	Nº de amostras	Soropositivos (%)	Autores
Rio Grande do Sul	Ovinos	1.331	0,16	COSTA <i>et al.</i> (2006)
Rio Grande do Sul	Bovinos	1.272	0,60	COSTA <i>et al.</i> (2006)
São Paulo	Ovinos	538	13,75	VENDITTI <i>et al.</i> (2009)
Minas Gerais	Ovinos	1.429	53,80	GOUVEIA <i>et al.</i> (2003a)
Minas Gerais	Caprinos	2.168	44,50	GOUVEIA <i>et al.</i> (2003a)
Minas Gerais	Bovinos	1.304	59,51	KONRAD <i>et al.</i> (2004)
Bahia	Ovinos	469	0,43	SOUZA <i>et al.</i> (2010)
Paraíba	Bovinos	137	4,38	MELO <i>et al.</i> (2000)
Paraíba	Ovinos	68	0,00	GOUVEIA <i>et al.</i> (2003b)
Paraíba	Ovinos	506	4,10	ALVES <i>et al.</i> (2009)
Ceará	Caprinos	1.865	30,60	SILVA (2002)

Por isso, SOUZA *et al.* (2010) demonstraram a necessidade de verificar a presença de mosquitos vetores e os sorotipos virais circulantes nas diferentes regiões para elucidar essa problemática da distribuição do VLA no país e a possibilidade de ocorrência da doença.

SILVA (2002) já havia demonstrado a disseminação do VLA em rebanhos caprinos do Ceará, inclusive nos municípios avaliados neste estudo, com exceção de Várzea Alegre, que não participou do levantamento citado. De 119 rebanhos caprinos amostrados, 99 (83,2%) foram positivos, sendo que dos 1.865 animais testados por IDGA, 570 (30,6%) foram reagentes.

No que diz respeito ao sexo, a ocorrência de fêmeas soropositivas foi maior que a de machos, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Além disso, houve maior número de animais soropositivos nos estratos entre 2 e 3 anos e maior que 3 anos. Entretanto, observou-se diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre os estratos de 1 a 2 anos e de 2 a 3 anos. Não houve diferença estatística significativa quanto ao tipo racial (Tabela 5).

SILVA (2002) observou que animais mais velhos têm maior probabilidade de entrarem em contato com o VLA, devido ao maior tempo de exposição ao vetor. SHRINGI; SHRINGI (2005) também verificaram maior soropositividade em animais adultos. Além disso, maior soropositividade tem sido observada em animais mestiços de tipos raciais importados (SILVA, 2002). Na verdade, a importação e o trânsito de ani-

mais infectados visando ao melhoramento genético de raças localmente adaptadas podem desempenhar importante papel epidemiológico na ocorrência do VLA, principalmente em regiões onde o clima não é favorável à multiplicação do vetor (MELO *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2010).

O IB realizado a partir da transferência das proteínas do antígeno do kit VMRD para a membrana de nitrocelulose demonstrou que os animais soropositivos no IDGA apresentaram forte reação para as proteínas virais VP2, VP4 e NS1. Já o soro padrão positivo do kit reagiu para as proteínas VP2, NS1, NS2 e principalmente VP7 (Fig. 1).

A VP2 compõe a camada externa do capsídeo viral. Age na interação do vírus com a célula hospedeira e contém epitopos responsáveis pela hemaglutinação, neutralização viral e especificidade aos sorotipos (BATTEN *et al.*, 2008). VP7 faz parte da camada intermediária e possui importante função na manutenção da integridade estrutural do capsídeo, protegendo o RNA viral. VP4 é uma enzima responsável por catalisar reações para formação do capsídeo. Já as proteínas não estruturais NS1 e NS2 são as mais expressadas em células infectadas. NS1 está relacionada com os efeitos citopatogênicos do vírus, causando alterações morfológicas nas células e NS2 é o principal constituinte dos corpúsculos de inclusões virais e se liga ao dsRNA, possuindo importância na replicação viral e montagem do capsídeo (SCHWARTZ-CORNIL *et al.*, 2008; ROY *et al.*, 2009).

Tabela 4 - Tipos climáticos e índices pluviométricos registrados em 2009, nos municípios cearenses estudados, durante inquérito epidemiológico de língua azul, 2012.

Município	Tipo climático	Índice pluviométrico (mm)	Soropositividade (%)
Granja	Semiárido brando	1.500 - 2.000	80
Jaguaribe	Semiárido	1.000 - 1.500	0
Massapê	Semiárido brando	1.000 - 1.500	0
Quixadá	Semiárido	1.000 - 1.500	0
Sobral	Semiárido	1.000 - 1.500	37,3
Tauá	Semiárido	584 - 800	8,8
Várzea Alegre	Semiárido brando	1.000 - 1.500	7,7

Fonte: FUNCEME (2011).

Tabela 5 - Distribuição de animais soropositivos para língua azul quanto ao sexo, faixa etária e tipo racial, em inquérito epidemiológico de rebanhos ovinos cearenses, 2012.

Variável	Estrato	Positivos*	%	Negativos	%	Total
Sexo	Macho	03 <sup>a</sup>	9,1	30	90,9	33
	Fêmea	71 <sup>b</sup>	29,8	167	70,2	238
Faixa etária	< 01 ano	06 <sup>ab</sup>	18,8	26	81,2	32
	1 - 2 anos	02 <sup>a</sup>	9,1	20	90,9	22
	2 - 3 anos	15 <sup>b</sup>	37,5	25	62,5	40
	> 03 anos	51 <sup>ab</sup>	28,8	126	71,2	177
Tipo racial	Dorper	04 <sup>a</sup>	57,14	03	42,86	07
	Santa Inês	34 <sup>a</sup>	30,91	76	69,09	110
	SRD/Somalis/Morada Nova	36 <sup>a</sup>	23,38	118	76,62	154

\*Letras diferentes entre linhas referentes à mesma variável indicam diferença estatística significativa ( $\chi^2$ ;  $p < 0,05$ ).

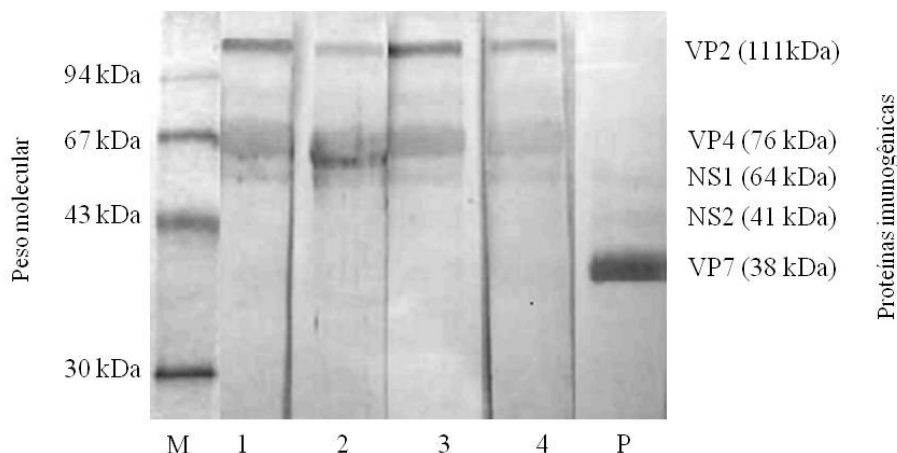


Fig. 1 - *Immunoblotting* com proteínas antigênicas do vírus da língua azul e soros positivos no IDGA. [M] marcador molecular; [1 a 4] soros positivos no IDGA de ovinos do Ceará; [P] soro padrão positivo (VMRD). Os animais soropositivos apresentaram forte reação para as proteínas virais VP2, VP4 e NS1. O soro padrão positivo reagiu principalmente com a proteína VP7.

Das diferentes proteínas antigênicas do VLA (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7, NS1, NS2 e NS3), a VP2 é a principal proteína a estimular a resposta imune protetora. Com a tecnologia de proteína recombinante, tem sido demonstrado que a VP2 sozinha é capaz de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (ROY *et al.*, 1990; ROY *et al.*, 2009). A forte reação apresentada contra a VP2 pelos animais soropositivos no IDGA pode estar relacionada com a ausência da enfermidade nos rebanhos avaliados, já que a principal resposta imune protetora se dá a partir da imunogenicidade desta proteína viral.

## CONCLUSÕES

A soropositividade para LA nos rebanhos ovinos estudados no Ceará foi alta, apesar da ausência de sinais clínicos nos animais, sugerindo que o vírus provavelmente ocorra de forma endêmica. Além disso, a resistência à doença apresentada pelos animais pode estar relacionada com a forte reação imunológica desses à proteína VP2. Sendo assim, outros estudos são necessários para melhor esclarecer a situação epidemiológica da LA no país, através da identificação dos vetores e sorotipos virais circulantes nas diferentes regiões.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa de doutorado aos pós-graduandos.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, F.A.L.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; SILVA, W.W.; SILVA, M.L.C.R.; LOBATO, Z.I.P.; CLEMENTINO, I.J. Soroprevalência e fatores de risco para a língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, v.39, n.2, p. 484-489, 2009.
- ARAGÃO, M.A.C.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F.S.F.; OLIVEIRA, A.A.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Maedi-Visna Vírus: produção de antígeno, análise protéica e antigênica. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.75, n.4, p. 423-429, 2008. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75\\_4/aragao.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_4/aragao.pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2011.
- ASTUDILLO, V.M. *Encuestas por muestro para estudios epidemiologicos en poblaciones animales*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la Salud - Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1979. 60p.
- BALDWIN, C.A.; MOSIER, D.A.; ROGERS, S.J.; BRAGG, C.R. An outbreak of disease in cattle due to bluetongue virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.3, p.252-255, 1991.
- BATTEN, C.A.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BIN-TARIF, A.; KGOSANA, L.; SWAIN, A.J.; CORTEYN, M.; DARPEL, K.; MELLOR, P.S.; ELLIOTT, H.G.; OURA, C.A.L. Bluetongue vírus: European Community inter-laboratory comparasion tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Veterinary Microbiology*, v.129, p.80-88, 2008. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.11.005
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

- CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; SCHERRER, N.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; BATTEN, C.; CORTYEN, M.; HOFMANN, M.; THUER, B. Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, v.138, p.11-19, 2009.
- CHAGAS, A.C.S.; PINHEIRO, R.R. *Língua Azul: conhecer para prevenir*. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 34p. (Documentos 49).
- CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J.W. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *The Veterinary Record*, n.151, p.301-302, 2002.
- COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMANN, G.P.; LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.2, p.273-275, 2006.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BRENDEL, K.A.; SMITH, D.C.; BURTON, A.H.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.; FAGAN, R.F.; ARNER, T.G. *Epi info, version 6: a word processing database and statistic program for epidemiology on micro-computers*. Atlanta, Georgia: Center for Disease Control and Prevention, 1994. 589p.
- ELBERS, A.R.W.; BACKX, A.; EKKER, H.M.; VAN DER SPEK, A.N.; VAN RIJN, P.A. Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, v.129, p.156-162, 2008.
- FIGUEIREDO, F.A.M.; OLIVEIRA, A.N.; LAGE, G.R.H.; CRUZ, L.C.G.; SACCHETTI, H.P.; PASSOS, A.H. Língua Azul - Presença de sintomas clínicos nos animais reagentes positivos em foco no município de Duque de Caxias, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.29, n.1, p.20-23, 2007.
- FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. Dados climáticos. Disponível em: <<http://www2.ipece.ce.gov.br/atlas>> Acesso em: 18 jun. 2011.
- GOUVEIA, A.M.G.; LIMA, F.A.; LOBATO, Z.I.P.; ABREU, C.P.; LAENDER, J.O.; TOLEDO, E.; CYPRESTE, B.M. Língua Azul em ovinos e caprinos em Minas Gerais. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO, 11., CONGRESSO BRASILEIRO, 5., CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA, 3., 2003, Salvador. *Anais*. Salvador: 2003a, p.51. (Resumo).
- GOUVEIA, A.M.G.; LIMA, F.A.; SOUSA, G.J.G.; LOBATO, Z.I.P.; SILVA, A.H.; SILVA, M.A.V.; CYPRESTE, B.M. Frequência sorológica da Maedi-Visna e Língua Azul em ovinos, em propriedades e matadouro na Paraíba. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO, 11., CONGRESSO BRASILEIRO, 5., CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA, 3., 2003, Salvador. *Anais*. Salvador: 2003b, p. 52. (Resumo).
- HARLON, E.; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 865p.
- HOFMANN, M.A.; RENZULLO, S.; MADER, M.; CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; THUER, B. Genetic characterization of Toggenburg Orbivirus, a new Bluetongue Virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.12, p.1855-1861, 2008.
- KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da Língua Azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, v.10, p.42-51, 2004.
- LAEMMI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LAGER, I.A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana*, v.40, n.3, p.89-93, 2004.
- LOBATO, Z.I.P. Língua Azul: a doença nos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.4, p.515-523, 1999.
- MacLACHLAN, N.J. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria Italiana*, v.40, p.462-467, 2004.
- MELLOR, P.S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides biting midges: their role as Arbovirus. *Annual Review Entomology*, v.45, p.307-340, 2000.
- MELLOR, P.S.; WITTMANN, E.J. Bluetongue virus in the Mediterranean basin, 1998-2001. *The Veterinary Journal*, v.164, p. 20-37, 2002. doi: 10.1053/tvj.2002.0713.
- MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C.; Anticorpos contra o vírus da Língua Azul em bovinos do sertão da Paraíba. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.1, p.19-20, 2000. doi.org/10.1590/S0102-09352000000100004.
- OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Bluetongue. Língua Azul. 2002. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a\\_A090.htm](http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A090.htm)>. Acesso em: 7 jul. 2008.
- PURSE, B.V.; MELLOR, P.S.; ROGERS, D.J.; SAMUEL, A.R.; MERTENS, P.P.C.; BAYLIS, M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p.171-181, 2005.

- ROY, P.; URAKAWA, T.; VAN DIJK, A.A.; ERASMUS, B.J. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *Journal of Virology*, v.64, n.5, p.1998-2003, 1990.
- ROY, P.; BOYCE, M.; NOAD, R. Prospects for improved bluetongue vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, v.7, n.2, p.120-128, 2009.
- SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.P.C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BRÉARD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.J.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, v.39, n.5, p.1-16, 2008. doi: 10.1051/vetres:2008023
- SHRINGI, S.; SHRINGI, B.N. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India. *Journal of Veterinary Science*, v.6, n.1, p.77-79, 2005.
- SILVA, M.X. *Soroprevalência da Língua Azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades do Ceará*. 2002. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- SOUZA, T.S.; COSTA, J.N.; MARTINEZ, P.M.; COSTA NETO, A.O.; PINHEIRO, R.R. Anticorpos contra o vírus da língua azul em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro, Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.77, n.3, p.419-427, 2010.
- TOMICH, R.G.P.; PELLEGRIN, A.O.; CAMPOS, F.S.; LOBATO, Z.I.P.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. *Epidemiologia do vírus da língua azul em rebanhos bovinos*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 26p. (Documentos 85).
- VELLEMA, P. Bluetongue in sheep: Question marks on bluetongue virus serotype 8 in Europe. *Small Ruminant Research*, v.76, 2008, p.141-148, 2008. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.12.009.
- VENDITTI, L.L.R.; NOGUEIRA, A.H.C.; STEFANO, E.; GALLETI, N.T.C.; PITUCO, E.M. Ocorrência da língua azul em cordeiros das regiões de Sorocaba e Araçatuba - SP, Brasil. In: FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 6., 2009, São Paulo. *Anais*. São Paulo: 2009 (Resumo).
- WILSON, A.; DARPEL, K.; MELLOR, P.S. Where does bluetongue virus sleep in the winter? *PLOS Biology*, v.6, n.08, p.1612-1617, 2008.

Recebido em: 20/7/11

Aceito em: 4/1/13