



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

DÉBORA PATRÍCIA FEITOSA MEDEIROS

**INTERFERÊNCIA DA PLUVIOSIDADE NA FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE
DOS ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM BOVINOS NÃO
VACINADOS**

FORTALEZA

2012

DÉBORA PATRÍCIA FEITOSA MEDEIROS

**INTERFERÊNCIA DA PLUVIOSIDADE NA FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE
DOS ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM BOVINOS NÃO
VACINADOS**

Monografia submetida ao Curso de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel.

Orientador : Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Tiemi Nagao Dias

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M437a Medeiros, Débora Patrícia Feitosa
Interferência da pluviosidade na frequência de positividade dos anticorpos contra o vírus da febre aftosa
em bovinos não vacinados/ Débora Patrícia Feitosa Medeiros. – 2012.
37 f. : il.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Nagao Dias

1. Febre Aftosa 2. Vacinas 3. Controle de Qualidade I. Título.

CDD 615.372

DÉBORA PATRÍCIA FEITOSA MEDEIROS

**INTERFERÊNCIA DA PLUVIOSIDADE NA FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE
DOS ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM BOVINOS NÃO
VACINADOS**

Monografia submetida ao Curso de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Aparecida Tiemi Nagao Dias
(orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Zirlane Castelo Branco Coelho
(Membro)
Universidade Federal do Ceará

Indira Mary Alves da Rocha
(Membro)
Farmacêutica

AGRADECIMENTOS

Ao autor da vida, que mesmo antes de eu nascer, ele já me conhecia até pelo meu nome.

Aos meus pais, Antonia Feitosa Medeiros e Inácio de Loiola Carlos Medeiros que não apenas me sustentaram financeiramente, mas me ensinou, pelo seu exemplo de vida, que sempre devemos acreditar em um futuro melhor e que Deus sempre recompensa os nossos esforços e o que você faz de bom pelos os outros nessa vida, só não podemos desistir.

Às minhas irmãs Acsa Rachel Feitosa Medeiros e Hérica Feitosa Medeiros por fazerem parte da minha vida e por vocês serem a melhor família que eu podia desejar.

Ao meu companheiro e amigo João Paulo Sampaio Eufrásio Machado, presente de Deus na minha vida e que sempre está do meu lado nos momentos bons e difíceis, sempre disposto a me ajudar independente dos esforços.

À minha orientadora Prof. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias por sua paciência, dedicação e pela disponibilidade de sempre fazer o seu melhor para ajudar seus alunos e a professora Zirlane Castelo Branco Coelho que aceitou a representar a banca, dispondo do seu tempo e dedicação.

À querida Rosane Maria Costa que orienta sempre com muita alegria e satisfação aos alunos como seguir as regras de trabalho, sempre ajudando a corrigir e nos guiando para fazermos o melhor.

À professora e coordenadora Maria de Fátima Oliveira faltam palavras para expressar a minha gratidão por todo zelo e cuidado com a matrícula, sempre facilitando e ajudando para que o sonho da formatura se tornasse uma realidade.

À minha supervisora Indira Mary Alves da Rocha por ter me acompanhado desde quando era uma estagiária inexperiente até me tornar uma profissional, sempre me ajudando e facilitando quando eu mais precisava.

À todas minhas amigas e companheiras da faculdade que sempre me ajudaram e deram apoio quando mais precisava, especialmente a Sara Fortes Ribeiro, Maraíza Alves Teixeira, Allana Bezerra e Lynara Neves que fizeram dos meus dias acadêmicos mais proveitosos e engraçados.

Às minhas companheiras do Controle de Qualidade que fazem com que a

minha rotina de trabalho se torne mais leve, fazendo com que pequenos momentos se tornem grandes e marcantes na minha vida.

Ao veterinário Péricles Montezuma pelo seu empenho e cuidado com os animais bovinos na fazenda e sua disponibilidade em sempre ajudar fornecendo dados.

A todos da MSD saúde animal pela autorização e colaboração para que esse trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

A febre aftosa afeta caprinos, suínos e bovinos, sendo um dos grandes responsáveis de problemas econômicos no mundo. Como medida de controle, quando os animais são acometidos pela doença, eles devem ser sacrificados, causando assim um enorme prejuízo econômico. A vacina deve conter os sorotipos virais mais frequentes no país e constitui a principal medida profilática.

Antes dos animais serem vacinados, eles devem ser avaliados quanto à presença de anticorpos. Para tal avaliação, grupos de animais saudáveis com idade entre 18 a 24 meses, e peso mínimo de 200 Kg são identificados e submetidos à coleta de sangue para dosagem de anticorpos contra o vírus da febre aftosa através do método imunoenzimático em fase sólida. Somente os animais que apresentam negatividade para os anticorpos são selecionados para a vacinação. Esse estudo é realizado antes de se produzir cada lote de vacina. A pergunta de partida do presente trabalho baseou-se na questão se a pluviosidade interfere na frequência de positividade de anticorpos contra o vírus da febre aftosa em bovinos não vacinados.

Um total de 3149 animais foi testado nos anos de 2010 e 2011, utilizando o teste imunoenzimático fornecido pela Organização Panamericana de Febre Aftosa para pesquisa de anticorpos contra os sorotipos O1 Campos BR/58, A24 Cruzeiro e C3 Indaial. Embora fosse verificados altos índices de positividade de anticorpos em períodos chuvosos, elevados índices de positividade foram também observados em períodos de baixa pluviosidade, tanto em 2010, como em 2011. Da mesma forma, baixos índices de positividade dos anticorpos foram observados em períodos chuvosos, tanto em 2010, como em 2011. Não podemos afirmar que o baixo nível de positividade estava associado com baixo número de animais testados, pois, no mês de abril de 2010, foram testados 280 animais e o índice de positividade de anticorpos foi de apenas 29,6%. Durante o referido mês, foi observado o maior índice pluviométrico daquele ano. O presente trabalho mostra que não há associação entre pluviosidade e positividade de anticorpos em bovinos não vacinados.

Palavras-chave: Febre aftosa, anticorpos, controle de qualidade, pluviosidade.

ABSTRACT

Foot-Mouth Disease affects goats, pigs and cattle, being largely responsible for economic problems in the world. As a control, when the animals are affected by the disease, they should be killed, thereby causing a huge economic loss. The vaccine should contain the most common serotypes in the country and is the main prophylactic measure. Before the mice be vaccinated, they must be evaluated for the presence of antibodies. For this evaluation, groups of healthy animals aged 18-24 months with a minimum weight of 200 kg are identified and submitted to blood sampling for antibody determination against FMD virus by solid-phase enzyme immunoassay. Only the animals showing negativity for the antibodies are selected for immunization. This study is carried out before each batch of vaccine production. The starting question of this study was based on the question of whether the pluviosity interferes with the frequency of antibody positivity against FMD virus in unvaccinated cattle. A total of 3149 animals were tested in 2010 and 2011, employing the enzyme immunoassay supplied by the Pan American Foot and Mouth Disease for detection of antibodies against the serotypes BR/58 O1 Campos, A24 Cruzeiro and C3 Indaial. While high rates of antibody positivity were observed in rainy periods, high levels of positivity were also observed in periods of low rainfall, both in 2010 and 2011. Similarly, low levels of antibody positivity were observed during rainy periods, both in 2010 and 2011. We cannot say that low levels of positivity were associated with a low number of animals tested, once in april 2010, 280 animals were tested and the antibody positivity rate was only 29.6%. During that month, we observed the highest level of pluviosity that year. The present study shows no association between pluviosity and positivity of antibodies in unvaccinated cattle.

Key words: Foot-Mouth Disease, antibodies, quality control, pluviosity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tipos de vírus da febre aftosa no período de 1970-1990 em várias regiões do Brasil	12
Figura 2 - Número de focos de animais infectados com o vírus da febre aftosa no período de 1970 a 2002	13
Figura 3 - Lesões orais causadas pelo vírus da febre aftosa	14
Figura 4 - Aumento da salivação em animais infectados com o vírus da febre aftosa	15
Figura 5 - Foto dos tanques de produção de vírus na Indústria	16
Figura 6 - Coleta de sangue bovino na sua jugular bovina	19
Figura 7 - Laboratório de realização do teste de ELISA	20
Figura 8 - Utilização de máscara com filtro para Vapores Orgânicos	21
Figura 9 - Placas sensibilizadas com soro hiperimune de coelho	22
Figura 10 - Etapa de lavagem das microplacas	23
Figura 11 - Realização da diluição das amostras de soro bovino	24
Figura 12 - Placas protegidas da luz.....	25
Figura 13 - Placas bloqueadas com ácido sulfúrico.....	26
Figura 14 - Gráfico relacionando porcentagem de positividade com o índice pluviométrico no ano de 2010.....	29
Figura 15 - Gráfico relacionando porcentagem de positividade com o índice pluviométrico no ano de 2011.....	29
Quadro 1 - Quantidade de focos da Febre Aftosa durante o período de 1960-1990 no Brasil.	11
Quadro 2 - Layout com a posição dos soros e controle do Teste de seleção	24
Tabela 1 - Porcentagem de animais positivos nos meses de janeiro à dezembro de 2010 associado com o índice pluviométrico	28
Tabela 2 - Porcentagem de animais positivos nos meses de janeiro à dezembro de 2011 associado com o índice pluviométrico	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Importância da febre aftosa	9
1.2	Febre aftosa no Brasil aftosa	9
1.3	O vírus da febre aftosa	9
1.4	Epidemiologia	10
1.5	Transmissão, manifestação clínica e diagnóstico da doença aftosa	14
1.6	Profilaxia	16
2	PERGUNTA DE PARTIDA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo geral	18
3.2	Objetivos específicos	18
4	METODOLOGIA	19
4.1	Sensibilização de placas	21
4.2	Bloqueio de placas	22
4.3	Teste de seleção	23
4.4	Etapa de inibição	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da Febre Aftosa

A febre aftosa é uma patologia que acomete bovinos, suínos, e provoca um grave impacto econômico na sociedade.

Em 1997, a febre aftosa causou grandes perdas econômicas em Taiwan, tendo causado um prejuízo de milhões de dólares na indústria de carne suína. Além dos prejuízos da carne infectada propriamente dita, gastos foram realizados com as medidas de contenção para evitar que a doença se disseminasse e causasse maiores prejuízos. A estimativa desses gastos foi em torno de 400 milhões de dólares para o controle da doença em Taiwan (CHEN et al., 2007).

Em setembro de 2001, mais de 4 milhões de animais foram sacrificados no Reino Unido, o que provocou um prejuízo de 4,7 milhões de dólares na indústria alimentícia e 4,5 milhões de dólares no setor turístico (KITCHING; HUBTER; THRUSFIELD, 2005).

O Brasil é o proprietário do segundo maior rebanho efetivo do mundo. Em 2004, assumiu a liderança das exportações, chegando a exportar para 180 países. O valor bruto de produção atingiu 67 bilhões, o que evidencia sua importância sócio-econômica (BRASIL, 2012).

Em vista desses aspectos, torna-se fundamental a busca da erradicação da febre aftosa a nível mundial.

1.2 Febre aftosa no Brasil

A entrada do vírus de febre aftosa no continente americano ocorreu através dos animais trazidos pelos colonizadores (MELO; LÓPEZ, 2002).

1.3 Vírus da febre aftosa

Os vírus de forma geral são pequenos (20-300 nm de diâmetro), sendo que alguns apresentam como material genético RNA, enquanto outros, DNA de fita simples ou dupla. O material genético dos vírus geralmente está revestido por um envoltório protéico denominado de capsídeo. Os vírus são considerados parasitas intracelulares obrigatórios e dependem das células hospedeiras para sua multiplicação. Quando se encontram no ambiente extracelular, são inertes e

denominados partículas virais ou vírions. Um único vírus é capaz de produzir milhões de novos vírus em algumas horas. Se o vírus encontra uma célula susceptível, ele invagina-se para dentro da célula e, utilizando o metabolismo celular, produz novas proteínas e material genético, gerando novas partículas virais (MADIGAN et al., 2003). Os vírus resistem durante meses em carcaças congeladas, principalmente na medula óssea. Perduram muito tempo na erva dos pastos e persiste por tempo prolongado na farinha de ossos e nos couros (MILLEN, 1988).

São sensíveis a altas temperaturas e condições de pH abaixo de 6 ou acima de 10. Em pH neutro, o vírus sobrevive dias ou semanas (KITICHING; HUBTER; THRUSFIELD, 2004).

1.4 Epidemiologia

Os vírus da febre aftosa estão entre os patógenos mais contagiosos que afetam bovinos, caprinos, ovinos, suínos e búfalos domésticos. Pertencem ao gênero *Aphthovirus*, da família *Picornaviridae* (CHEN et al., 2007). Os suínos são bastante susceptíveis à infecção pelos vírus, o que talvez tenha facilitado a disseminação dos mesmos (LYRA; SILVA, 2004).

Existem sete diferentes sorotipos de vírus da febre aftosa, sendo o tipo O o mais frequente, seguido pelo A, C, SAT (*South African Territory*) -1, SAT-2, SAT-3 e Ásia-1. Os quatro últimos são considerados raros no Brasil. Os sorotipos que são mais frequentemente isolados na América Latina são O, A e C (MILLEN, 1983).

No Brasil, a doença teve seu primeiro registro em 1895, época em que foram iniciadas as importações de gados de raça européia e o surgimento da indústria frigorífica. A febre aftosa foi considerada endêmica no Brasil desde o início do século XX (LYRA; SILVA, 2004). Nos anos 60, houve endemia pelos tipos O (55%), A (26%) e C (26%) em animais com até dois anos de idade (GRAÇA; PARDI; BROWN, 1966). O vírus sorotipo A apresenta uma grande capacidade de recombinação genética e replicação, possuindo vários subtipos. Foram identificados os subtipos A24 no Brasil e A79 na Argentina (LYRA; SILVA, 2004).

A partir de 1960, deu-se o início a um programa de estratégia contra a doença, através de melhoria na infraestrutura laboratorial, treinamento de pessoal, conscientização dos produtores, produção e administração de vacina, notificação de focos e diagnóstico da doença (LYRA; SILVA, 2004).

Controle de qualidade da vacina e avaliação dos focos foi realizado a partir de 1970. Observa-se que na década de 80, os casos já estavam bastante reduzidos, tendo sido considerados os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, livres de infecção no ano de 1998 (ALONSO F. et al., 1982).

O Quadro 1 apresenta o número de focos de bovinos infectados pelos vírus da febre aftosa durante o período de 1960-1990 no Brasil.

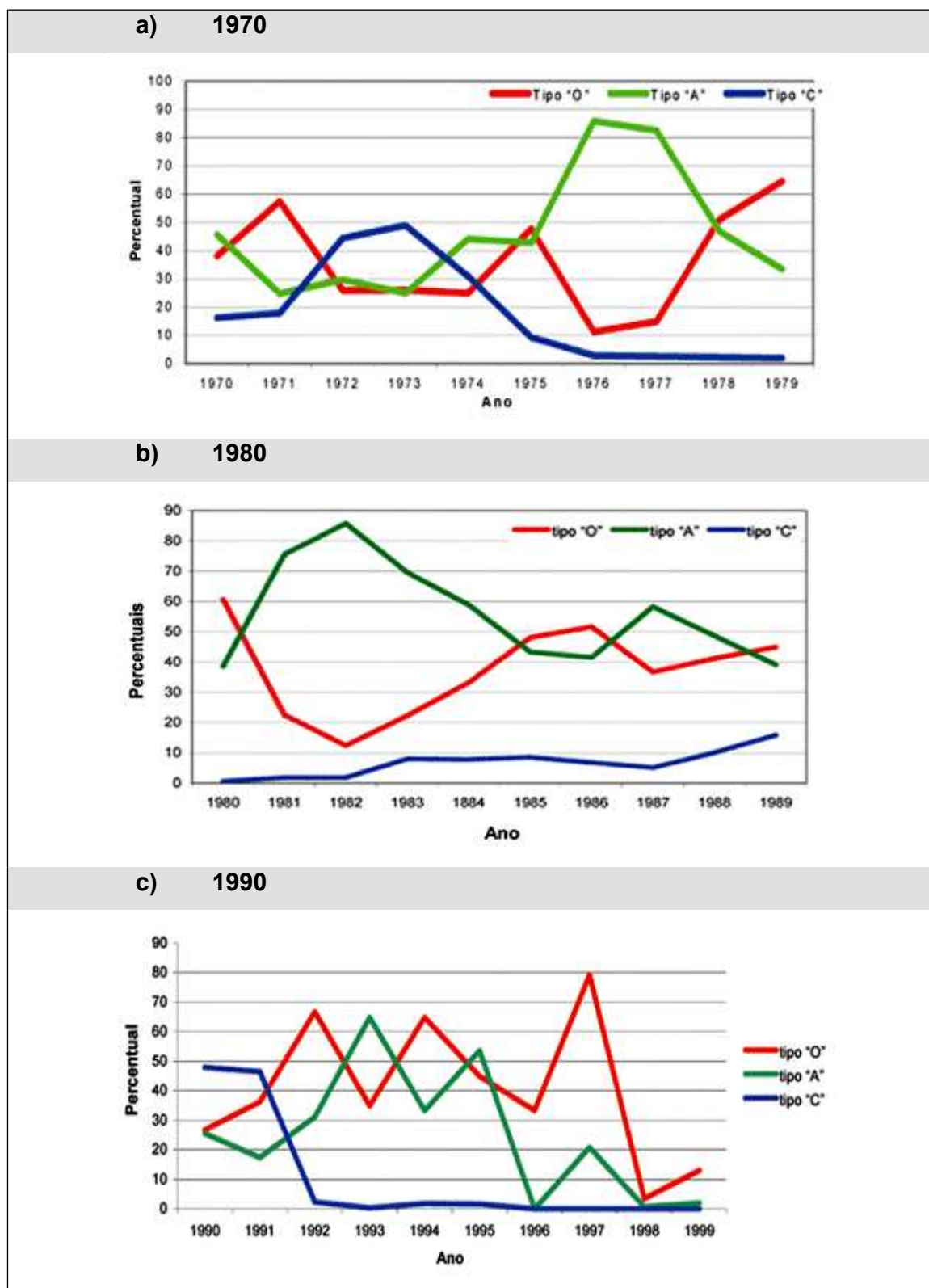
Quadro 1 - Quantidade de focos da Febre Aftosa durante o período de 1960-1990 no Brasil.

ANO	Quantidade de focos	ANO	Quantidade de focos	ANO	Quantidade de focos	ANO	Quantidade de focos
1960	687	1970	2.529	1980	7.850	1990	989
1961	280	1971	8.353	19781	4.222	1991	757
1962	182	1972	7.177	1982	3.022	1992	1.232
1963	182	1973	7.877	1983	1.454	1993	1.433
1964	211	1974	2.959	1984	1.481	1994	2.093
1965	163	1975	4.681	1985	1.511	1995	589
1966	205	1976	10.295	1986	1.699	1996	215
1967	111	1977	8.595	1987	1.319	1997	167
1968	255	1978	6.992	1988	1.314	1998	38
1969	472	1979	6.656	1989	1.376	1999	37
Total	2748	Total	66.114	Total	25.248	Total	7.550

Fonte: (LYRA; SILVA, 2004)

A Figura 1 apresenta os tipos de vírus isolados de casos bovinos em várias regiões do Brasil no período de 1970 a 1990.

Figura 1 - Tipos de vírus da febre aftosa isolados de casos de bovinos infectados em várias regiões do Brasil no período de 1970-1990.



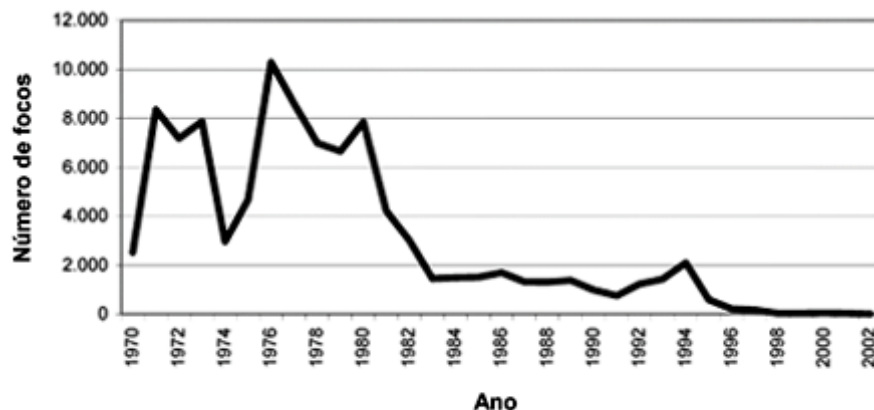
Fonte: (LYRA; SILVA, 2004).

Observa-se pela Figura 1 que houve um aumento de casos devido ao tipo A nos períodos de 1976-1978, 1981-1983 e 1993-1995. O tipo O esteve presente durante os anos de 1970, 1975, 1980, no período de 1985-1989, e ao longo da década de 90 até o ano de 1996. O tipo C esteve presente principalmente nos anos de 1990-1991.

A queda no número de casos a partir de 1980 pode ter sido devida à melhora da qualidade da vacina bem como de outras estratégias de controle da disseminação (LYRA; SILVA, 2004).

A Figura 2 mostra de forma bem clara o perfil de redução de casos infectados no período de 1970 a 2002.

Figura 2 - Número de focos de animais infectados com os vírus da febre aftosa no período de 1970 a 2002.



Fonte: (LYRA, SILVA, 2004)

Em 2000, foi detectado um novo foco no Rio Grande do Sul e em 2005, foi relatada uma suspeita de contaminação em um município do Mato Grosso do Sul (LYRA; SILVA, 2008).

Com intuito de aprimorar o comércio de produtos de origem animal, com destaque para carne bovina e suína, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com auxílio dos serviços veterinários estaduais e do setor agroprodutivo passou a coordenar o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA). Este programa possui como principal estratégia a implantação e manutenção de zonas livres da doença, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE)

(BRASIL, 2012).

Em novembro de 2002, os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul restituíram a condição sanitária de zona livre de febre aftosa. Ainda nesse período, foram incorporadas as regiões Sudeste e Centro-Oeste à zona livre de febre aftosa. Entretanto, o aparecimento de casos em outros países da América Latina, vizinhos ao Brasil, dificultaram o sucesso do programa (BRASIL, 2012).

1.5 Transmissão, manifestações clínicas e diagnóstico da doença

A febre aftosa é conhecida também como *Foot – and – Mouth disease* (FMD), caracterizada por formação de vesículas similares a aftas na boca e patas e, dessa forma foi chamada de aftosa. Enquanto as manifestações clínicas podem ser graves em bovinos e suínos, as ovelhas e cabras podem apresentar infecção subclínica. Por vezes o contágio é indireto e, nesse caso, o vírus é transportado através de alimentos, água, ar e pássaros, apesar de ser sensível ao calor e à luz. Da mesma forma, os cuidadores levam em suas mãos, na roupa ou nos calçados, partículas virais, os quais são capazes de infectar animais sadios. Após infecção, há um período de incubação, que varia de dezoito horas a três semanas (MILLEN, 1988).

Os vírus multiplicam-se em células epiteliais na mucosa oral (Figura 3), nasal e também na pele, e próximo ao casco, causando lesões vesiculadas (KITCHING; HUTBER; THRUSFIELD, 2005).

Figura 3 – Lesões orais causadas pelo vírus da febre aftosa



Fonte: (BRASIL, 2012).

Após um período aproximado de 2 dias, as vesículas se rompem. Diante do rompimento das vesículas, o líquido interior contendo vírus dissemina-se no ambiente pela formação de aerossóis. Há um aumento da salivação (Figura 4) e da dificuldade de deambular, o que leva o animal à anorexia e, como consequência, ao emagrecimento (RÉMOND; KAISER; LEBRETON, 2002).

Figura 4 – Aumento da salivação em animais infectados com o vírus da febre aftosa



Fonte: (BRASIL, 2012).

Há também comprometimento na produção do leite. O bezerro infectado pode vir a óbito em decorrência de miocardite viral. A recuperação de um animal acometido pela febre aftosa é um evento bastante provável, uma vez que a taxa de letalidade pela doença é baixa. No entanto, sua taxa de morbidade é elevada, uma vez que animais susceptíveis infectados apresentaram manifestação clínica. Aqueles que se curam, tornam-se portadores assintomáticos. (ACHA; SZYFRES, 1986).

Uma dificuldade é o diagnóstico diferencial com algumas doenças que se assemelham do ponto de vista de aspectos clínicos. Como exemplos, as manifestações clínicas da doença de vesícula suína (SVD) são similares aos da febre aftosa, assim como o herpes bovino, febre catarral, peste bovina e outras doenças que podem ocorrer na mucosa bovina (RÉMOND; KAISER; LEBRETON,

2002).

1.6 Profilaxia

Como não há tratamento contra a febre aftosa, são necessárias medidas profiláticas através de vacinação dos animais com até 24 meses de vida. A vacina é inativada, deve ser administrada em um volume de 5 mL via subcutânea e intramuscular, e protege o animal durante um período de até 6 meses. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento fornece o lote de vírus semente. Como a produção de vírus que compõe a vacina é definida pela realidade epidemiológica do país, atualmente utiliza-se para a produção das vacinas, os tipos O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial (Procedimento operacional padrão Biossegurança-Produção, 2011). As quantidades de cada componente da vacina constituem segredo de produção.

A vacina é obtida a partir da inativação do vírus com bromidrato de etilamina (figura 5). O processo de inativação deve ser monitorado, de forma a evitar futuras infecções pelo próprio vírus vacinal. É importante também levar em conta durante esse processo, que o capsídeo viral, responsável pela indução de imunidade pela vacina, deve permanecer íntegro (DOEL, 1999).

Figura 5. Tanques de inativação dos vírus por bromidrato de etilamina.



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

2 PERGUNTA DE PARTIDA

Será a pluviosidade interfere na frequência de positividade dos anticorpos contra o vírus da febre aftosa em bovinos não vacinados?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a interferência da pluviosidade na frequência de positividade dos anticorpos contra o vírus da febre aftosa em bovinos não vacinados.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença de anticorpos contra vírus da febre aftosa em bovinos não vacinados;
- Avaliar a frequência de positividade dos anticorpos de acordo com os índices pluviométricos mensais nos anos de 2010 e 2011.

4 METODOLOGIA

Durante o ano de 2010 e 2011 foram feitas seleções mensais de animais de algumas fazendas para avaliação da presença de anticorpos contra vírus da febre aftosa. Para o presente trabalho, foram escolhidos os animais que pertenciam a uma fazenda credenciada localizada em Umirim, CE. Grupos de animais eram identificados e todos eram submetidos à coleta de sangue. O número total de animais avaliados de janeiro de 2010 a dezembro de 2011 foi de 3149.

Coletava-se uma amostra de sangue da veia jugular do animal (10 mL) em tubos fechados à vácuo, conforme mostra a figura 6. Os tubos eram identificados pelo número do animal, fazenda e data da coleta. As amostras foram transportadas com gelo reciclável para o laboratório de análise, tomando-se os devidos cuidados para não haver hemólise durante o transporte. No laboratório, todos os tubos eram centrifugados, sendo submetidos em seguida ao teste imunoenzimático. Retirava-se uma alíquota (contra-prova) de cada animal e armazenada por dois anos a -20°C .

Figura 6. Coleta de sangue bovino a partir da veia jugular.



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

Os testes imunoenzimáticos para dosagem de anticorpos contra o vírus da febre aftosa foram cedidos pela Unidade de Saúde Pública Veterinária PANAFTOSA (Centro Panamericano de Febre Aftosa, 2009). Cada teste servia para detectar anticorpos contra os sorotipos O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial.

O laboratório onde foram realizados os testes apresentava nível de biossegurança de risco 1 (Figura 7), pois o sangue do animal bovino confere risco limitado para o analista e para a comunidade. Os equipamentos de proteção individual para o risco 1 são jaleco e luvas. Como medida adicional de proteção, utilizou-se máscara com filtro 900 A1 para Vapores Orgânicos - Drager para aplicação do substrato cromogênico nas placas, uma vez que o cromógeno, no caso a ortofenilenodiamina, é um reagente carcinogênico.

Figura 7. Laboratório para realização dos testes imunoenzimáticos com nível de biossegurança de risco 1.



Fonte: (MEDEIROS, 2012).

Figura 8. Utilização de máscara com filtro 900 A1 para Vapores Orgânicos - Drager para

aplicação da solução cromogênica contendo ortofenilenodiamina.



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

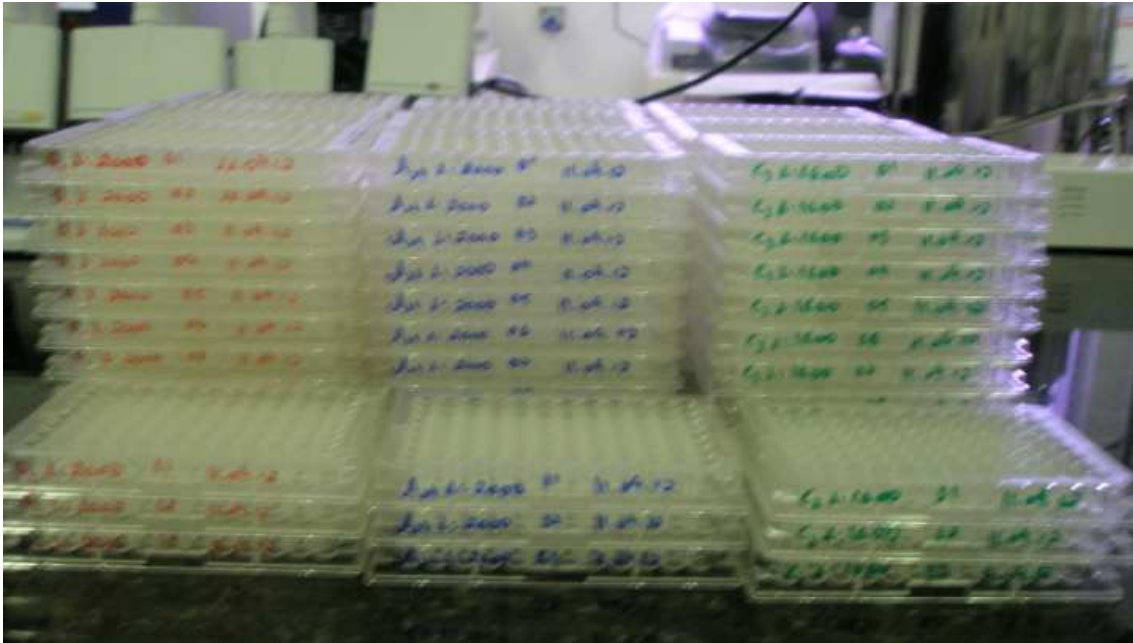
O teste imunoenzimático em fase sólida (ELISA) para detecção de anticorpos contra os vírus da febre aftosa divide-se em etapas, como descrito a seguir: O princípio do teste baseou-se em um ensaio de inibição.

4.1 Sensibilização das placas

Soro hiperimune de coelho, contendo anticorpos contra os sorotipos descritos anteriormente, foi adsorvido em microplacas de poliestireno (Maxisorp, Nunc, USA) com volumes de 100 μ L, nas concentrações de 1:2000 (para as cepas O1 e A24) e 1:1600 (para a cepa C3) em solução tampão carbonato- bicarbonato (Apêndice A). O período de sensibilização foi de 16 a 20 h a 4° C.

Com objetivo de facilitar o manuseio das placas, as mesmas foram identificadas (Figura 9) com a cor vermelha (para O1), azul (para A24) e verde (para C3).

Figura 9 – Placas sensibilizadas com soro hiperimune de coelho (O1/vermelho, A24/azul e C3/verde).



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

4.2 Bloqueio de Placas

Após a fase de adsorção, no dia seguinte, as placas eram deixadas por 1h na temperatura ambiente (t.a.). Durante esse período, a solução bloqueadora, contendo ovalbumina 1% em solução salina tamponada com fosfato (PBS, apêndice B e C), eram preparadas.

Após descarte da solução de sensibilização das placas, as mesmas eram submetidas a lavagem (1x) com 200 μ L de solução de salina 0,9% (Apêndice D), com auxílio de uma lavadora automática de placas (Biotek, USA, Figura 10).

A seguir, a solução bloqueadora era acrescentada, deixando-se 1 h a t.a. Após nova lavagem (1x), prosseguia-se com as demais etapas. Aquelas placas que não eram prontamente utilizadas, deveriam ser devidamente embaladas com filme plástico e armazenadas por um período máximo de 6 meses a -20°C (Figura 8).

Figura 10 – Etapa de lavagem das microplacas, após sensibilização das mesmas.



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

4.3 Teste de Seleção

A solução diluente das amostras de soro constituía de ovoalbumina grau II 1% e Tween 20 0,05% em solução de PBS (apêndices E e F). Uma quantidade maior de solução era preparada e estocada durante 6 meses a -20°C em alíquotas de 250 mL. Um dia antes do teste, a solução deveria ser descongelada. No dia do teste, todos os reagentes são deixados à t.a, previamente à sua utilização.

4.4 Etapa de inibição

Microplacas de fundo U flexíveis (Falcon, USA), devidamente identificadas com cores diferentes de acordo com os sorotipos eram utilizadas para diluição das amostras. O quadro 2 apresenta um esquema da placa.

Quadro 2. Esquema de diluição das amostras de soro bovinos em microplacas.

	1	2	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S 1	S 1	S9	S9	S1 7	S1 7	S2 5	S2 5	S33	S33	S36	S36
B	S 2	S 2	S1 0	S1 0	S1 8	S1 8	S2 6	S2 6	S34	S34	S37	S37
C	S 3	S 3	S1 1	S1 1	S1 9	S1 9	S2 7	S2 7	S35	S35	S38	S38
D	S 4	S 4	S1 2	S1 2	S2 0	S2 0	S2 8	S2 8	C- ½	C- 1/10	C- 1/50	C- 1/250
E	S 5	S 5	S1 3	S1 3	S2 1	S2 1	S2 9	S2 9	C+ 1/10	C+ 1/50	C+ 1/250	C+ 1/1250
F	S 6	S 6	S1 4	S1 4	S2 2	S2 2	S3 0	S3 0	C++ 1/ 200	C++ 1/ 1000	C++ 1/ 5000	C++ 1/ 25000
G	S 7	S 7	S1 5	S1 5	S2 3	S2 3	S3 1	S3 1	C Ag	C Ag	C Ag	C Ag
H	S 8	S 8	S1 6	S1 6	S2 4	S2 4	S3 2	S3 2	Branco	Branco	Branco	Branco

Resumidamente, os “brancos” eram aqueles que continham todos os reagentes exceto o soro a ser testado e o antígeno. O controle negativo era testado na diluição $\frac{1}{2}$, e os controles positivos fraco e forte, nas diluições respectivas de $\frac{1}{10}$ e $\frac{1}{200}$. As amostras de soro teste eram diluídas com a solução diluente a $\frac{1}{12}$ (sorotipos O1 e C3) e $\frac{1}{20}$ (sorotipo A4) (Figura 11).

Figura 11. Realização da diluição das amostras de soro bovino nas microplacas.

Fonte: (MEDEIROS, 2011).

Em seguida, adicionava-se igual volume de antígeno inativado, preparado

previamente em um tubo cônico com a solução diluente (APÊNDICE F).

A seguir, as placas eram incubadas em incubadora a 37°C por 1 h, sendo que durante os primeiros 20 min, as placas eram deixadas sob agitação.

A seguir, volumes de 50µL eram transferidos para as microplacas sensibilizadas, deixando-se mais 30 min sob agitação, devidamente protegidas com filme plástico.

As placas eram lavadas (3x) com salina 0,85% contendo Tween 20 0,05%.

A seguir, volumes de 50µL de soro hiperimune de cobaio diluído a 1:600 para as cepas O1 e C3 e 1:300 para A24 eram incubados nos poços, deixando-se as placas a 37° C durante 30 min sob agitação. Após novas lavagens, conjugado de cabra anti-imunoglobulinas de cobaio marcados com peroxidase em uma diluição que varia para cada kit enviado pelo Panaftosa, no qual o antígeno nem sempre possui a mesma diluição, deixando-se as placas a 37° C por 30 min sob agitação. Em seguida às lavagens, eram adicionados 50µL de solução de substrato cromogênica, contendo 0,4 mg de ortofenilenodiamina (Sigma, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0, contendo peróxido de hidrogênio na concentração final de 0,01%. Após 15 min protegidas da luz (Figura 12), a reação era interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (Apêndice J).

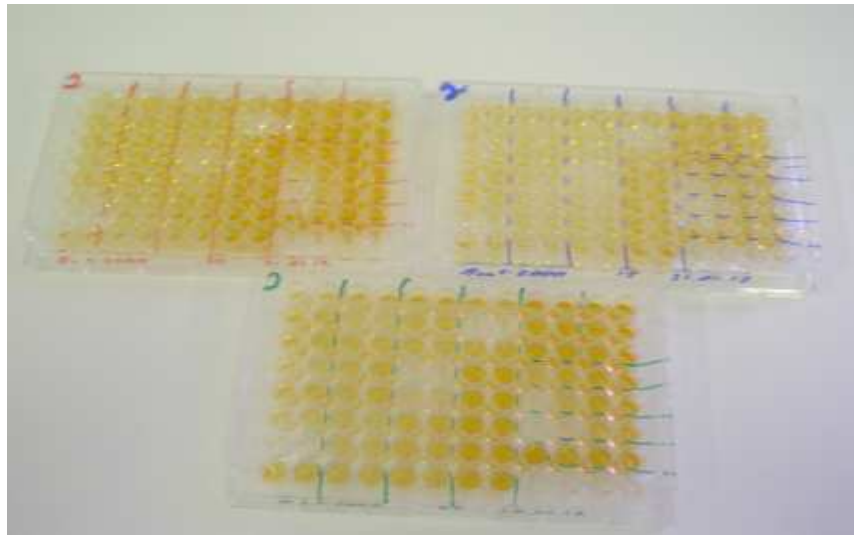
Figura 12. Incubação das microplacas protegidas da luz.



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

A leitura das absorbâncias (Figura 13) era realizada com auxílio de espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 490nm.

Figura 13. Revelação das microplacas com solução de substrato cromogênico e bloqueadas com ácido sulfúrico.



Fonte: (MEDEIROS, 2011).

Os resultados eram interpretados de acordo com a fórmula: média das absorbâncias dos poços das amostras dividida pela média das absorbâncias dos controles de antígeno x 100. Índices superiores a 50% eram consideradas negativas para o sorotipo em estudo. Índices inferiores a 50% eram consideradas positivas para o sorotipo em estudo. Resultados equivalentes a $50\% \pm 1\%$ eram considerados inconclusivos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe um entendimento no meio agropecuário, que o clima exerce influência no desenvolvimento dos animais. Sabe-se que quanto maior a temperatura, menor a produtividade do leite (ANTUNES et al., 2009). Fatores climáticos são levados em consideração para que proprietários de fazendas decidam sobre qual tipo de animal deve ser criado em determinado local. Como exemplos, animais de climas frios não se adaptam em regiões tropicais (MEDEIROS; VIEIRA, 1997).

Um estudo (GONZALEZ, et al., 2004) realizado em uma região de Pelotas, Rio Grande do Sul, avaliou-se a produção de leite em cada mês de animais bovinos em um período de 11 meses. Verificou-se que a produção era influenciada pelas variações climáticas nas diferentes estações do ano. Alterações na temperatura do ar e solo estão entre os principais fatores a serem levados em consideração na qualidade e produção de leite. No mesmo estudo, verificou-se que a pluviosidade não interferia na qualidade do leite.

Crescimento retardado e baixo desempenho reprodutivo podem ser decorrentes de deficiência de iodo que, por sua vez, pode estar associada com distância do mar e baixa pluviosidade (EMBRAPA, acessado em 26/05/2012).

A produção de forragens influencia na dinâmica do ciclo parasitário. Segundo MALACCO (acessado em 26/05/2012), temperaturas de 16° a 26° C, e elevada umidade relativa do ar favorecem o crescimento parasitário no ambiente e, portanto, com maior risco de infestação dos animais.

O presente trabalho procurou estabelecer associação entre índices pluviométricos e frequência de positividade de anticorpos contra vírus da febre aftosa em bovinos não vacinados.

As tabelas 1 e 2 apresentam os dados de frequência de positividade dos anticorpos e os índice pluviométrico obtidos mensalmente, referentes aos anos de 2010 e 2011, respectivamente. Os índices pluviométricos foram obtidos da FUNCEME (Fundação Cearense de Meteorologia e Recurso Hídricos).

Tabela 1 - Porcentagem de positividade de anticorpos anti-vírus da febre aftosa e índices pluviométricos nos meses de janeiro a dezembro de 2010.

Ano de 2010	Média índice Pluviométrico (mm)	Nº Animais Analisados	Nº Animais Positivos	% Positividade
Janeiro	72	151	77	51,0
Fevereiro	13	237	125	53,0
Março	189	152	109	71,2
Abril	221	280	83	29,6
Maio	152	133	77	57,8
Junho	10	100	64	64,0
Julho	0	38	14	36,0
Agosto	0	64	22	34,0
Setembro	0	77	18	23,0
Outubro	0	72	34	47,0
Novembro	0	68	28	41,0
Dezembro	0	152	94	61,0

Tabela 2 - Porcentagem de positividade de anticorpos anti-vírus da febre aftosa e índices pluviométricos nos meses de janeiro a dezembro de 2011.

Ano de 2011	Média índice Pluviométrico (mm)	Nº Animais Analisados	Nº Animais Positivos	% Positividade
Janeiro	311	38	24	63,1
Fevereiro	186	64	33	51,5
Março	357	82	34	41,4
Abril	330	163	78	47,8
Maio	232	76	65	85,5
Junho	58	73	52	71,2
Julho	0	146	96	65,7
Agosto	0	190	69	36,3
Setembro	0	114	66	57,8
Outubro	0	201	147	73,1

Novembro	0	319	190	59,5
Dezembro	0	159	59	59,0

Os dados foram também apresentados em forma de gráficos, como mostrados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Porcentagem de positividade dos anticorpos anti-vírus da febre aftosa e índices pluviométricos nos meses de janeiro a dezembro de 2010.

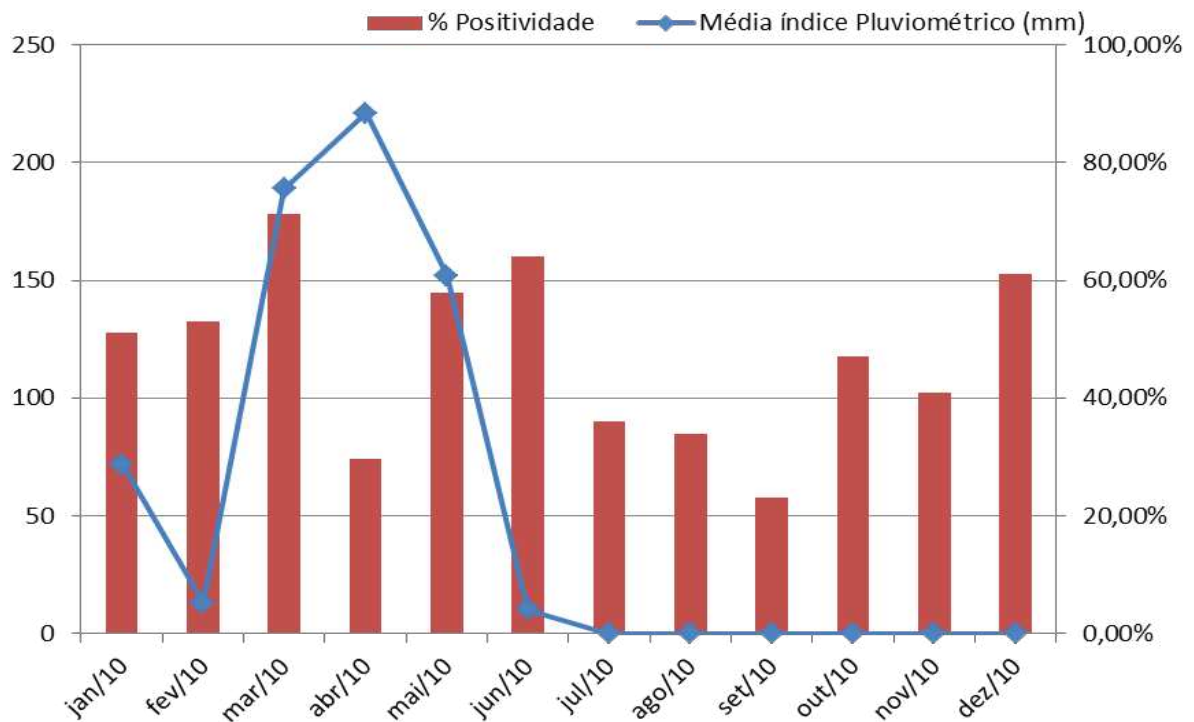
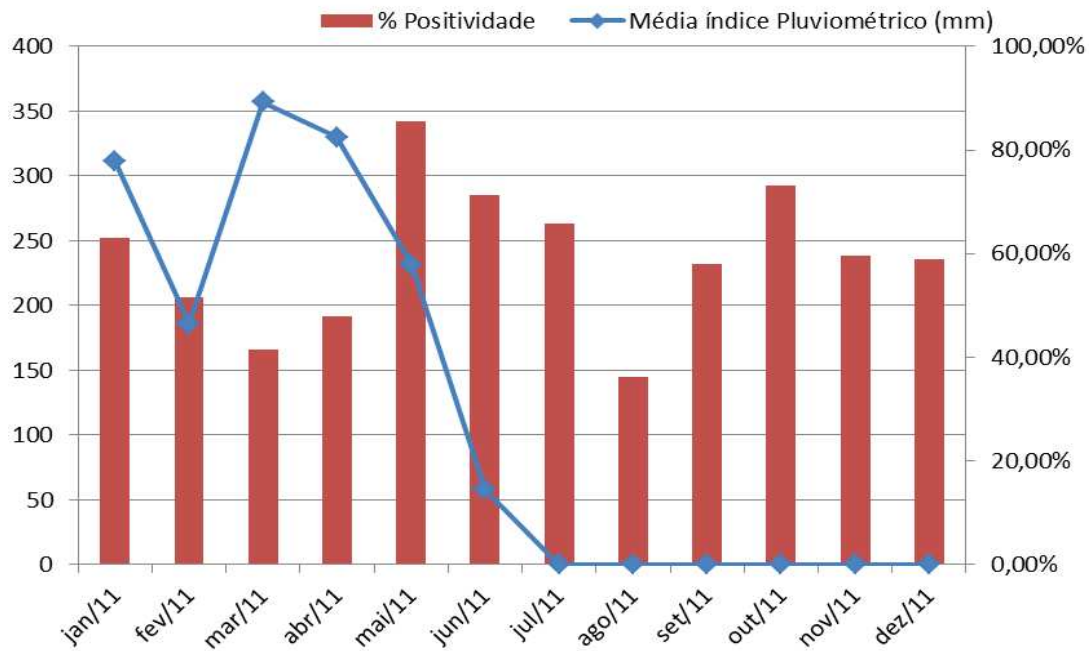


Figura 15 - Porcentagem de positividade dos anticorpos anti-vírus da febre aftosa e índices pluviométricos nos meses de janeiro a dezembro de 2011.



Embora possamos verificar que os maiores índices de positividade de anticorpos foram obtidos em períodos chuvosos, altos índices de positividade foram também observados em períodos de baixa pluviosidade, tanto em 2010, como em 2011. Da mesma forma, baixos índices de positividade dos anticorpos foram observados em períodos chuvosos, tanto em 2010, como em 2011. Não podemos afirmar que o baixo nível de positividade estava associado com baixo número de animais testados, pois, no mês de abril de 2010, foram testados 280 animais e o índice de positividade de anticorpos foi de apenas 29,6% (Tabela 1). Durante o referido mês, foi observado o maior índice pluviométrico daquele ano.

O presente trabalho mostra que não há associação entre pluviosidade e a positividade de anticorpos em bovinos não vacinados. Os resultados são consistentes uma vez que o número de animais testados foi significativo ($n=3149$), os métodos imunoenzimáticos utilizados para analisar os anticorpos são constantemente validados através de controles de qualidade internos e externos, portanto, os resultados podem ser considerados confiáveis.

6 CONCLUSÕES

- Os índices de positividade de anticorpos contra vírus da febre aftosa variaram de 23% a 71,2% em 2010 e de 36,3% a 85,5% em 2011.
- Não houve interferência da positividade desses animais com a presença de chuva, pois tanto no ano de 2010 como no de 2011, houve alta porcentagem de animais positivos com baixos índices pluviométricos, assim como houve baixa porcentagem de animais positivos em altos índices pluviométricos.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. [S.I.]: Organización Panamericana de Saúde, 1986.

ALONSO F., A. et al. Actualizacion de cepas del virus de la fiebre aftosa de importância epidemiológica em América del Sur. **Bol. Cent. Panamerican. Fiebre Aftosa**, v. 53, p. 3-18, enero/dic. 1987.

ANTUNES, M. *et al.* **Efeito do estresse calórico sobre a produção e reprodução do gado leiteiro**. Pelotas: Núcleo de Pesquisa e Extensão em Pecuária, Universidade Federal de Pelotas, 2009.

BRASIL. Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Mercado interno**. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Lesões de febre aftosa e de outras doenças incluídas no Sistema Nacional de Vigilância de doenças vesiculares**: coletânea de Imagens. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20aftosa/MIOLO_colet_imagens.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2012.

CHEN, S. P. *et al.* Comparasion of sensitivity and specificity in three commercial foot-and-mouth disease virus non-structural protein ELISA kits with swine sera in Taiwan. **Vet. Microbiol.**, v. 119, n. 2/4, p. 164-172, 2007.

RÉMOND, M.; KAISER, C.; LEBRETON, F.; Diagnosis and screening of foot-and-mouth disease. **Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases**, v.25, p.309-320, 2002.

DOEL, T.R. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. **Vaccine**, v.17, p.1767-1771, 1999.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. **Gráfico de chuvas dos postos pluviométricos**. Disponível em: <<http://www.funceme.br/index.php/areas/tempo/grafico-de-chuvas-dos-postos-pluviometricos>>. Acesso em: 4 maio 2012.

GRAÇA, V. P.; PARDI, M. C.; BROWN, P. P. **Projeto de combate à febre aftosa**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1966.

KITCHING, R. P.; HUBTER, A. M.; THRUSFIELD, M. V. A review of foot –and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modeling of disease. **Vet. J.**, v. 169, n. 2, p. 197-209, 2005.

LYRA, T. M. P.; SILVA, J. A. A febre aftosa no Brasil, 1960-2002. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 5, p. 565-576, 2004.

LYRA, T. M. P.; SILVA, J. A. Evolução do Conhecimento Científico e Sua Aplicação nas Políticas Públicas de Controle e Erradicação da Febre Aftosa no Brasil, 1950-2008. **A Hora da Veterinária**, p. 17–21, 2008.

MEDEIROS, V.; VIEIRA, D. **Bioclimatologia animal**. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia da Faculdade Rural do Rio de Janeiro, 1997.

MELO, E. C.; LÓPEZ, A. Control de la fiebre aftosa: La experiencia americana. **Rev. Sci. Off .int. Epiz.**, p. 689-694, 2002.

MILLEN, E. **Guia técnico agropecuário**. [S.l.]: Veterinária e Zootecnia Rural Abril, 1988.

GONZALES, H.L. et al. **Avaliação da Qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeitos dos meses do ano**. R. Bras. Zootec. vol.33, n.6, p.1531-1543, 2004.

MALACCO, M.A.F. **CONTROLE PARASITÁRIO NA FÊMEA BOVINA**. Merial, artigos técnicos, 2007. Disponível em: <http://www.br.merial.com/rage/artigos_tecnicos/cont_par_fem_bovina.pdf>. Acesso em: 26 maio 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Deficiência de Microelementos e Reprodução**. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/ct/ct23/04deficienciasmicroelementos.html>>. Acesso em: 26 maio 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. Madrid: Prentice-Hall, p.1011, 2003.

APÊNDICE A

TAMPÃO CARBONATO – BICARBONATO 0,05M

Produto	Quantidade	Molaridade Final
Carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) PM 106	0,80 g	0,015M
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) PM 84	1,47g	0,035M
Água de Osmose	500 mL	-

Dissolver 0,80g de Na_2CO_3 e 1,47g de NaHCO_3 em um balão volumétrico de 500mL com aproximadamente 300mL de água de osmose. Depois de dissolvido, completar com 500mL de água de osmose. Confirmar pH. Se o mesmo estiver entre 9,55 e 9,65, a solução é aceita. Caso contrário, a solução deve ser descartada e preparar uma nova. O pH das soluções tampão não deve ser ajustado.

APÊNDICE B

TAMPÃO SALINA FOSFATADA (PBS)

Produto	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl) PM 58,44	8,0g
Cloreto de potássio (KCl) PM 74,55	0,2g

Fosfato de sódio bibásico 12 hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) PM 358,14	2,90g
Fosfato de potássio anidro (KH_2PO_4) PM 136,09	0,2g
Água de osmose q.s.p	1000mL

Dissolver os sais completamente, trabalhando sempre a temperatura ambiente. Medir o pH das soluções no qual deve estar entre 7,40-7,60. O pH das soluções tampão não deve ser ajustado. Soluções com pH fora da faixa mencionada não devem ser usadas.

APÊNDICE C

SOLUÇÃO BLOQUEADORA

Produto	Quantidade
PBS pH 7,40 – 7,60	350mL
Ovoalbumina grau V	3,5g

Agitar até completa dissolução. Preparar no momento do uso.

APÊNDICE D

SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA 0,85%

Produto	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl) PM 58,44	85g
Água de Osmose	10L

Dissolver 85g de cloreto de sódio em 9 litros de água de osmose. Mantendo em agitação permanente. Após dissolver, completar o volume com água de osmose. Ajustar o pH 7,20 – 7,40 com solução de bicarbonato de sódio 7,5%. Manter por 1 mês a temperatura ambiente.

APÊNDICE E

TAMPÃO DILUIÇÃO

Produto	Quantidade
PBS pH 7,40 – 7,60	2000mL
Poli-oxietileno sorbitan monolaureato (TWEEN 20)	1,0mL
Ovoalbumina Grau II	20g

Dissolver completamente a ovoalbumina. Homogeneizar bem. Distribuir em recipientes de 250 mL. Armazenar a -20°C por 6 meses.

APÊNDICE F

TAMPÃO DILUIÇÃO + SOROS BLOQUEADORES

Produto	Quantidade
PBS	70 mL
Soro Normal Bovino 2%	1,4 mL
Soro Fetal de Coelho 2%	1,4 mL

Medir 70mL do tampão fosfatado P.B.S, retirar o volume correspondente aos soros bloqueadores e adicionar 1,4mL do SFC (Soro Fetal de Coelho) e 1,4mL do SNB (Soro Normal Bovino). Os soros bloqueadores são fornecidos nos kits do PANAFTOSA.

APÊNDICE G

FOSFATO DE SÓDIO – 0,2M

Produto	Quantidade
Fosfato disódico anidro (Na_2HPO_4) PM 142	2,84g
Água de osmose q.s.p	100mL

Dissolver 2,84g de fosfato disódico anidro em balão volumétrico de 100mL em 50mL de água de osmose. Após dissolução completar o volume com 100mL de água de osmose. Armazenar a 4°C por 2 meses. Antes de usar deixar em temperatura ambiente e verificar a ausência de precipitados ou contaminantes.

APÊNDICE H

ÁCIDO CÍTRICO – 0,1M

Produto	Quantidade
Ácido cítrico monohidratado (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O) PM 210	2,10g
Água de Osmose q.s.p	100mL

Dissolver 2,10g de ácido cítrico em balão volumétrico de 100mL em 50mL de água de osmose. Após dissolução completar o volume com 100mL de água de osmose. Armazenar a 4°C por 2 meses. Antes de usar deixar em temperatura ambiente e verificar a ausência de precipitados ou contaminantes.

APÊNDICE I

TAMPÃO ÁCIDO DILUENTE DO SUBSTRATO ORTO-FENIL-DIAMINA

Produto	Volume
a) Ácido Cítrico 0,1M	26mL
b) Fosfato de Sódio 0,2M	28mL
c) Água de Osmose	46mL
Volume total	100mL

Misturar as soluções (a,b,c) e armazená-la em frasco de vidro a temperatura ambiente por 7-8 dias. Verificar a ausência de precipitados ou contaminantes. Medir o pH que deve ser muito próximo a 5,0. Para o uso fracionar o volume necessário e agregar o peróxido de hidrogênio antes de diluir o OPD, seguinte proporções mostradas na tabela abaixo:

Para volume de 25mL

Soluções	Volume
Tampão ácido	25mL
Peróxido de hidrogênio (*)	10µL
OPD (**)	10mg

(*) Cuidado: ler com atenção as recomendações do fabricante. Muito cuidado ao trabalhar, fortemente corrosivo, usar luvas, preparar imediatamente antes de usar.

(**) Cuidado: Produto perigoso para saúde. Tóxico, alergênico, cancerígeno. Ao utilizar proteger os olhos e mãos. Ter cuidado ao descartar, buscar informações com as autoridades locais evitando procedimentos inadequados.

APÊNDICE J

ÁCIDO SULFÚRICO 3N

Produto	Quantidade
H ₂ SO ₄ PM 98 (*)	84,1mL
Água de Osmose q.s.p	1000mL

(*) Cuidado: Ter cuidado ao preparar. Usar capela. Fortemente corrosivo, usar luvas para proteger as mãos. Colocar o recipiente que contém água de osmose dentro do outro recipiente com gelo. Depois, agregar lentamente o ácido na água.

APÊNDICE K

SOLUÇÃO VIRULICIDA

Produto	Quantidade
Ácido cítrico (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇) PM 210	20g
Ácido acético glacial (CH ₃ COOH) PM 60	10mL
Água de Osmose q.s.p	2000mL

Dissolver 20g de ácido cítrico em balão volumétrico de 2000mL com 500mL de água destilada. Adicionar 10mL de ácido acético. Após dissolução completar o volume para 2000mL com água de osmose. Manter a temperatura ambiente por três meses.