



mv&z

• REVISTA DE EDUCAÇÃO
• CONTINUADA EM
• MEDICINA VETERINÁRIA
• E ZOOTECNIA
• JOURNAL OF CONTINUING EDUCATION IN
• ANIMAL SCIENCE

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO • ISSN 2179-6645 • VOL 9 • Nº 3 • 2011

II ENDESA

Leia os resumos dos artigos apresentados

HIGIENE ALIMENTAR

A incidência do Botulismo no Brasil, entre 1999 e 2008

GRANDES ANIMAIS

Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil):
influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha
e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular

Dados internacionais de catalogação na publicação

Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Publicação do Conselho Regional de Medicina Veterinária. - v. 9, n. 3 (2011) -. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, 1998 - v. : il. ; 28 cm.

Quadrimestral
Continuação de: Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, São Paulo, v. 9, n. 2 (2011)
ISSN 2179-6645

1. Medicina veterinária. I. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo.

Deusa mitológica cercada de animais. Ilustração de Ike Motta baseada no original da Escola de Medicina Veterinária de São Paulo F. Ranzini - 1930



EX LIBRIS



CRMV-SP

GRANDES ANIMAIS - BUBALINOS

6 Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular

HIGIENE ALIMENTAR

14 A incidência do Botulismo no Brasil entre 1999 e 2008

ZOONOSES

20 Raiva: uma doença antiga, mas ainda atual

RESUMOS

30 II ENDESA
Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal

PALESTRAS

78 XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abraveq)

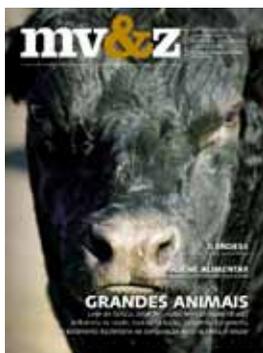
99 Normas para publicação

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO – CRMV-SP

- DIRETORIA EXECUTIVA**
Presidente MV Francisco Cavalcanti de Almeida
Vice-Presidente MV Iveraldo dos Santos Dutra
Secretário Geral MV Odemilson Donizete Mossero
Tesoureiro MV Mário Eduardo Pulga
Conselheiros Efetivos MV Carlos Maurício Leal
 MV Cláudio Regis Depes
 MV Eliana Kobayashi
 MV Márcio Rangel de Mello
 MV Otávio Diniz
 Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos
Conselheiros Suplentes MV Denise Aparecida de Souza Campos
 MV Antonio Guilherme Machado de Castro
 MV Maria Lucia Marques de Assis Aquino
 MV José Rafael Modolo
 MV Luiz Antonio Abreu e Souza
- Delegacia Regional de Araçatuba** Rua Oscar Rodrigues Alves, 55
 7º andar – Sala 12
 Fone 18 3622 6156 – Fax 18 3622 8520
 dr.aracatuba@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Botucatu** Rua Amando de Barros, 1.040
 Fone/Fax 14 3815 6839
 dr.botucatu@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Campinas** Av. Dr. Campos Sales, 532 – Sala 23
 Fone/Fax 19 3236 2447
 dr.campinas@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Marília** Av. Rio Branco, 936 – 7º andar
 Fone/Fax 14 3422 5011
 dr.marilia@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Presidente Prudente** Av. Cel. José Soares Marcondes, 983 – Sala 61
 Fone 18 3221 4303 – Fax 18 3223 4218
 dr.prudente@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Ribeirão Preto** Rua Visconde de Inhaúma, 490
 Conjunto 306 a 308
 Fone/Fax 16 3636 8771
 dr.ribeirao@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Santos** Av. Almirante Cochrane, 194, cj. 52
 Fone 13 3227 6395 – Fax 13 3227 6395
 dr.santos@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de São José do Rio Preto** Rua Marechal Deodoro, 3.011 – 8º andar
 Fone/Fax 17 3235 1045
 dr.riopreto@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Sorocaba** Rua Sete de Setembro, 287
 16º andar – Conjunto 165
 Fone/Fax 15 3224 2197
 dr.sorocaba@crmvsp.gov.br
- Delegacia Regional de Taubaté** Rua Jacques Felix, 615
 Fone: 12 3632 2188 – Fax 12 3622 7560
 dr.taubate@crmvsp.gov.br

REVISTA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA EM MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

- CONSELHO EDITORIAL**
Editor Científico Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos
Editores Associados MV Alexandre Jacques Louis Develey
 Prof. Dr. José César Panetta
 Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel
 (Academia Paulista de Medicina Veterinária – Apamvet)
- COMISSÃO EDITORIAL**
Presidente Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos
 Prof. Dr. José Rafael Modolo
 MV Mário Eduardo Pulga
- CORPO EDITORIAL AD HOC** MV Eliana Kobayashi
 Prof. Dr. José de Angelis Côrtes
 Profª Dra. Lúcia Baldassi
 MV Luciana Hardt Gomes
 Profª Dra. Maria de Lourdes B. Reichmann
 MV Nádia Maria Bueno Fernandes Dias
 Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
- Assessoria de Comunicação**
Editor Responsável Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos
Jornalista Responsável Thais Cardoso – MTB: 44.208/SP
- Sede do CRMV-SP** Rua Apeninos, 1088 – Paraíso – São Paulo, SP
 Fone 11 5908 4799 – Fax 11 5084 4907
 www.crmvsp.gov.br
- Revisão Técnica** Academia Paulista de Medicina Veterinária (Apamvet)
Projeto gráfico Plínio Fernandes – Traço Leal
Diagramação RS Press Editora
Impressão Rettec Artes Gráficas
Periodicidade Quadrimestral
Tiragem 28.000 exemplares
- Distribuição gratuita** Imagens e textos dos artigos são de responsabilidade dos autores.



Uma publicação



Foto: Giane Portal
www.sxc.hu

Colega,



A **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP** está cumprindo a missão para a qual foi concebida. A demanda dos Colegas de diferentes especialidades da Medicina Veterinária e da Zootecnia que submetem artigos para publicação neste veículo tem aumentado. A revista é distribuída para todos os profissionais do Estado de São Paulo e também para Instituições de Ensino e Pesquisa do País. Os revisores escolhidos para a análise dos artigos são minuciosos, detalhistas e se esmeram para que os artigos sejam de interesse e boa qualidade. A Equipe envolvida na formatação e diagramação é dinâmica, ativa e se esforça ao máximo para que a apresentação seja precisa, moderna e atraente.

Neste terceiro número do ano de 2011, na área de grandes animais, é apresentada uma avaliação dos fatores que afetam a qualidade do leite de búfalas criadas no Brasil; no capítulo da higiene alimentar, é efetuada uma análise crítica da série histórica dos casos de Botulismo em seres humanos no Brasil, no período de 1999 a 2008; e na área das zoonoses, é apresentada uma profunda e detalhada atualização sobre a história, etiologia e epidemiologia da raiva com destaque para os reservatórios animais presentes nos ecossistemas silvestre, rural e urbano.

A publicação dos resumos dos trabalhos apresentados no II Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal (ENDESA) e das Palestras desenvolvidas na XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abravec) procura atender o objetivo de dar maior visibilidade para o conteúdo de eventos técnico/científicos, divulgando informações inovadoras e avançadas para os profissionais que não tiveram a oportunidade de participar dos mesmos.

Abertos a sugestões e críticas construtivas a Comissão Editorial do CRMV-SP coloca-se à disposição do colega para receber comentários, propostas de temas e recomendações.

O Conselho é de todos!

Francisco Cavalcanti de Almeida
Presidente do CRMV-SP



Fale conosco

comunicacao@crmvsp.org.br

Leite de búfalas Murrah, criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular

Milk of Murrah buffaloes bred in São Paulo (Brazil): influence of age, lactation phase, time of milking and bacterial isolation in the physical-chemical and cell composition

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar valores físico-químicos e celulares do leite de búfalas criadas em São Paulo, Brasil, assim como evidenciar relações entre o isolamento bacteriano e alterações nesses constituintes, contribuindo dessa forma para o diagnóstico das diferentes formas de mastite. Os valores considerados como de referência para o leite de búfalas, segundo as fases de lactação (inicial, intermediária e final), foram respectivamente: para o pH – 6,89; 6,85 e 6,9; para a eletrocondutividade – 3,82; 4,02 e 4,49 mS/cm; para os teores de cloreto – 18,21; 20,13 e 26,49 mg/dl; para os teores de gordura – 4,25; 3,70 e 3,56 g/dl; para os teores de proteína – 3,97; 4,03 e 4,5 g/dl; para os teores de lactose – 5,11; 5,08 e 4,81 g/dl; para os teores de sólidos totais – 14,55; 13,88 e 13,93 g/dl e para o número de células somáticas – 29.000; 29.000 e 26.000 cel/ml. As bactérias isoladas com maior frequência foram as dos gêneros: *Corynebacterium* (28,5%); *Staphylococcus* (24,7%); *Streptococcus* (15,8%); e *Arcanobacterium pyogenes* (11,4%), com uma prevalência igual a 20,1%. O número de isolamentos bacterianos aumentou significativamente com o evoluir da lactação. Em contraste, o momento da ordenha não influenciou no número de isolamentos.

Summary

The objective of the present study was to evaluate physical-chemical and cellular contents of the milk of buffaloes bred in the state of São Paulo, Brazil, and to draw relationships between these values and microbiological results, contributing significantly for the diagnosis of different forms of mastitis. Reference values for buffalo milk, according to the phase of lactation (beginning, middle and end of lactation) were, respectively: pH, 6.89; 6.85 and 6.9; electro conductivity, 3.82; 4.02 and 4.49 mS/cm; chloride content, 18.72; 20.13 and 26.49 mg/dl; fat content 4.25; 3.70 and 3.56 g/dl; protein content, 3.97; 4.03 and 4.5 g/dl; lactose content, 5.11; 5.08 and 4.81 g/dl; total solid content, 14.55; 13.88 and 13.93 g/dl, and somatic cell counts, 29,000; 29,000 and 26,000 cells/ml. Results support that the phase of lactation influence pH, electroconductivity, chloride, fat, protein, lactose and total solid contents, as well as somatic cell counts. Fat, protein, lactose, total solid and somatic cell counts contents were influenced by the moment of sample collection (before or after milking), respectively, with the following values: 3.90 and 8.9 g/dl; 4.12 and 3.67 g/dl; 5.02 and 4.64 g/dl; 14.18 and 18.31 g/dl, and 29,000 and 56,000 cells/ml. Bacterial genera more frequently isolated were *Corynebacterium* sp (28.5%); *Staphylococcus* sp (24.7%); *Streptococcus* sp (15.8%); and *Arcanobacterium pyogenes* (11.4%), with prevalence equal to 20.1%. The frequency of bacterial isolation increased significantly with lactation. However, the moment of milking did not influence isolation. There was a relationship between the variation in some milk constituents that present clinical significance for the diagnosis of buffalo mastitis.

Paula A. S. Bastos ¹

Eduardo H. Birgel ²

Rua Joaquim Távora, 979/32, SP
São Paulo, Brasil – 04015-002.
✉ paula.dea@terra.com.br



Palavras-chave

Búfalos, Leite, Mastite, Constituintes do leite.

Keywords

Buffalo, Milk, Mastitis, Milk compounds.

O leite de búfalas apresenta alto valor nutritivo e um ótimo rendimento na elaboração de seus derivados (PATIÑO et al., 2011a). A crescente utilização desses derivados valorizou a espécie bubalina na pecuária leiteira mundial (SENO et al., 2007). Dessa forma, o conhecimento dos aspectos relacionados à saúde da glândula mamária das búfalas é importante para que se possa desenvolver e aplicar técnicas mais avançadas de prevenção e controle das infecções intramamárias desses animais (ARAÚJO & GHELLER, 2005).

Portanto, o diagnóstico eficaz e preciso é de extrema importância para controle da mastite em búfalas (VIANA et al., 2010). Vários autores atestaram a necessidade da realização de pesquisas regionais que promovessem o conhecimento das reais características do leite de búfalas criadas em diferentes regiões (COELHO et al., 2004), com vistas à adoção de valores de referência auxiliares no diagnóstico clínico e, principalmente, para a efetivação do controle de qualidade do leite produzido e destinado ao consumo dos humanos (MESQUITA et al., 2002).

O período de lactação dos animais, o clima da região, a raça e a alimentação influenciam a composição físico-química do leite (PATEL, 1993). Estudos associando os constituintes físico-químicos e celulares do leite aos resultados microbiológicos têm contribuído no diagnóstico das diferentes formas de mastite (DELLA LIBERA, 1998), que se constitui como a afecção que mais onera a criação de rebanhos leiteiros.

Vianni et al. (1990) verificaram a prevalência de 8,8% de mastite

¹ Doutora pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Professora dos Cursos de Medicina Veterinária das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU) e Universidade Metropolitana de Santos (Unimes).

² Professor titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, Brasil.

MICROORGANISMOS	NÚMERO ABSOLUTO E RELATIVO
Corynebacterium spp*	45 (28,5%) ^A
Staphylococcus spp.	39 (24,7%) ^{AB}
Streptococcus spp.	25 (15,8%) ^{BC}
Arcanobacterium pyogenes *	18 (11,4%) ^C
Outros	31 (19,6%) ^A
Total de isolamento	158

* M Microrganismos isolados ou associados (p>0,05).

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística entre os resultados (p<0,01).

TABELA 1 – Bactérias mais frequentes no leite de búfalas sadias criadas em São Paulo–Brasil

em búfalas leiteiras. Valores superiores foram identificados por Costa et al. (1997a), que detectaram uma prevalência de 23,7% de mastite em búfalas, na qual os gêneros bacterianos *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus agalactiae* foram isolados respectivamente em 59,25%; 17,59%; e 12,96% dos quartos pesquisados.

Em virtude do crescimento da produção de leite de búfalas em vários países e no Brasil, foram investigados valores da constituição físico-química e celular do leite, bem como a influência das infecções mamárias nos principais elementos constituintes do leite, visando contribuir no diagnóstico clínico das mastites em búfalas.

FASES DE LACTAÇÃO	NÚMERO DE AMOSTRAS			SIGNIFICÂNCIA
	TOTAL	ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO		
		NEGATIVOS	POSITIVOS	
Inicial	288	260 (90,3%)	28 ^c (9,7%)	p<0,05
Intermediária	256	203 (79,3%)	53 ^b (20,7%)	
Final	240	172 (71,6%)	68 ^a (28,4%)	

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os resultados

TABELA 2 – Isolamento microbiológico no leite de búfalas sadias criadas em São Paulo – Brasil, segundo as fases da lactação

VARIÁVEIS	NÚMERO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CEL/ML)		
	MICROB. NEGATIVO	MICROB. POSITIVO	ISOLAMENTO (%)
Até 4,5 anos;	34500 ^{Bb}	62000 ^{Ca}	13,9 ^B
5 a 10 anos;	42000 ^{Bb}	103000 ^{Ba}	25,5 ^A
+ 10 anos.	68500 ^{Ab}	407500 ^{Aa}	31,2 ^A
Significância	P<0,001	P<0,05	p<0,05

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si (p<0,03).

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os resultados.

TABELA 3 – Número de células somáticas no leite distribuído segundo o isolamento microbiológico e a idade de búfalas sadias, São Paulo – Brasil

VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E CELULARES DO LEITE	EXAME MICROBIOLÓGICO				
	Nº AMOSTRAS	NEGATIVO	Nº AMOSTRAS	POSITIVO	SIGNIFICÂNCIA
pH	307	6,88 ^a ± 0,12	84	6,88 ^a ± 0,16	p>0,8
Eletrocondutividade (MS/cm)	307	4,05 ^b ± 0,58	84	4,62 ^a ± 1,20	p<0,0001
Cloreto (g/dL)	307	21,13 ^b ± 6,72	84	26,29 ^a ± 12,62	p<0,0001
Gordura (g/dL)	290	3,89 ^a ± 1,51	80	3,96 ^a ± 1,57	p>0,7
Proteína (g/dL)	290	4,12 ^b ± 0,51	80	4,31 ^a ± 0,55	P<0,004
Lactose (g/dL)	290	5,03 ^a ± 0,33	80	4,72 ^b ± 0,62	p<0,0001
Sólidos totais (g/dL)	290	14,17 ^a ± 1,55	80	14,72 ^a ± 4,73	p>0,1
NCS (mediana) (cel/mL)	290	29000 ^b	80	105000 ^a	p<0,00001

Letras distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre os resultados.

TABELA 4 – Valores médios da eletrocondutividade, pH, cloreto, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e mediana do NCS do leite de búfalas sadias, São Paulo – Brasil. Distribuição segundo o isolamento microbiológico

Material e métodos

Foram utilizadas 98 búfalas da raça Murrah adultas, sadias, sem alterações ao exame físico dos quartos mamários. Os animais apresentavam-se em lactação plena, submetidos ao regime de duas ordenhas diárias, alimentados a pasto ou silagem, criados em clima tropical de altitude, característico do Estado de São Paulo.

Após o exame físico da glândula mamária, foi realizada a técnica do CMT (*California Mastitis Test*), considerando positivos os quartos mamários que apresentaram escores de 1 a 3+, conforme descrito por Schalm & Noorlander (1957) para a avaliação do número de células somáticas.

Foram colhidos dois pares de amostras de leite, um antes e outro depois da ordenha. Uma amostra foi colhida assepticamente, de acordo com o National Mastitis Council (HARMON et al., 1990), e destinada ao isolamento microbiológico. O leite foi semeado em ágar BHI e as bactérias isoladas foram identificadas utilizando-se Kit API™ de identificação bioquímica (BioMerieux, França). A outra amostra do par, colhida em frasco contendo bromopol, foi destinada à determinação dos teores de lactose, proteína, gordura e sólidos totais pela radiação infravermelha, utilizando equipamento Bentley 2000. O número de células somáticas foi determinado por citometria de fluxo, utilizando-se equipamento SOMACOUNT 500. Uma terceira amostra, colhida em frasco descontaminado, somente antes da ordenha, foi destinada às determinações do pH fazendo-se uso de potenciômetro, da eletrocondutividade, utilizando-se aparelho “Milk Checker”, e dos teores de cloreto por titulação coulométrica, utilizando-se analisador de cloretos.

Os isolamentos bacterianos foram considerados independentes quando gêneros bacterianos distintos foram isolados de amostras colhidas antes e depois da ordenha de um mesmo quarto, ou quando associados em uma mesma amostra de leite.

Os resultados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, por apresentarem distribuição paramétrica, os valores de pH, eletrocondutividade, teores de cloreto, gordura, proteína, lactose e sólidos totais foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre contrastes foram avaliadas pelo teste de Duncan (SAMPAIO, 1998). O número de células somáticas, por apresentar distribuição não paramétrica, foi submetido a comparações feitas pelo teste Mann-Whitney (SNEDECOR; COCHRAN, 1967).

Resultados e discussão

Foram obtidos 158 isolamentos bacterianos, totalizando uma prevalência de 20,1%. Esses resultados

concordaram com os verificados por Costa et al. (2000), com índice de 18,77%, e Costa et al. (1997a), que constataram prevalência de 23,7% e foram significativamente maiores que os obtidos por Vianni et al. (1990), que evidenciaram 8,81% de prevalência.

As bactérias com maior frequência de isolamento (**Tabela 1**) concordam com as obtidas por Costa et al. (1997a), que verificaram as respectivas porcentagens: 59,25%, 17,59% e 12,96% para *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae*.

A análise dos resultados do isolamento bacteriano nas diferentes fases da lactação (**Tabela 2**) demonstrou que a frequência de isolamentos aumentou com o decorrer das lactações. Atribuiu-se tal fato à maior manipulação da glândula na ordenha, principalmente quando há falhas de higiene, e na aplicação do sistema de ordenha, levando a maiores riscos de traumatismos das estruturas do úbere e favorecendo a instalação de processo infeccioso. Em contraste, Costa et al. (1997b) descreveram maior número de isolamentos bacterianos no início, diminuindo com o evoluir da lactação, sendo 45,3%, 27,6% e 1,7% as porcentagens nas fases inicial, intermediária e final da lactação, respectivamente.

Ao se avaliar a influência da idade das búfalas sadias sobre o isolamento bacteriano e o número de células somáticas (**Tabela 3**) nas amostras de leite, verificou-se que houve frequência maior de exames microbiológicos positivos nos animais mais velhos, concordando com os resultados de Saini et al. (1994). A manipulação da mama e o maior número de lactações no evoluir da idade contribuem para a instalação de processo inflamatório de origem infecciosa. Assim, os resultados obtidos concordaram com os obtidos por Ranucci et al. (1988), que consideraram o número de células somáticas um indicador seguro da infecção da glândula mamária de búfalas. Também concordaram com as conclusões de Silva e Silva (1994), ao destacarem o intervalo de 50.000 e 375.000 cel/ml como sendo o esperado para o leite de búfalas sadias. Segundo Jorge et al. (2005), búfalas Murrah submetidas a boas condições de manejo de ordenha apresentam leite com baixas porcentagens de células somáticas, sendo o leite com tal característica uma excelente matéria-prima para a fabricação de queijos e derivados.

Ao se analisar os valores dos constituintes físico-químicos e celulares distribuídos segundo os resultados do isolamento microbiológico (**Tabela 4**), não se observaram diferenças significativas entre o pH, a taxa de gordura e a concentração de sólidos totais nas amostras de leite com exame microbiológico negativo ou positivo. Em contraposição, os valores determinados para a eletrocondutividade, os teores de cloreto, a concentração de proteínas e o número

de células somáticas foram significativamente maiores nas amostras que apresentaram isolamento microbiológico. Por outro lado, os teores de lactose foram significativamente menores nas amostras sem isolamento microbiológico. Avaliando-se a média dos valores encontrados, independentemente da presença ou não de isolamento bacteriano, para os parâmetros sólidos totais (14,4g/dL), gordura (3,93g/dL),

proteína (4,22g/dL) e lactose (4,88g/dL), pode-se considerar que eles estão dentro dos intervalos propostos por Patiño (2011b) em revisão de trabalhos de pesquisa da composição química do leite de búfalas Murrah realizada no Brasil, a saber: 13,88-18,55g/dL para sólidos totais; 3,56-8,38g/dL para teores de gordura; 3,97-6,4g/dL para proteína e 4,81-5,34g/dL para teores de lactose.

VARIÁVEIS	FASES DA LACTAÇÃO									SIGNIFICÂNCIA
	INICIAL			INTERMEDIÁRIA			FINAL			
	N	VALOR	CV (%)	N	VALOR	CV (%)	N	VALOR	CV (%)	
pH	144	6,89 ^a ± 0,11	1,59	128	6,85 ^b ± 0,12	1,75	120	6,90 ^a ± 0,16	2,32	p<0,04
EC (mS/cm)	144	3,82 ^c ± 0,27	7,07	128	4,02 ^b ± 0,40	9,95	120	4,49 ^a ± 0,89	19,82	p<0,0001
Cloreto (mg/dL)	144	18,72 ^b ± 3,41	18,21	128	20,13 ^b ± 4,50	22,35	120	26,49 ^a ± 9,99	37,71	p<0,0001
Gordura (g/dL)	144	4,25 ^a ± 1,62	38,12	128	3,70 ^b ± 1,24	33,51	120	3,56 ^b ± 1,54	43,26	p<0,002
Proteína (g/dL)	144	3,97 ^b ± 0,48	12,09	128	4,03 ^b ± 0,37	9,18	120	4,50 ^a ± 0,54	12,00	p<0,0001
Lactose (g/dL)	144	5,11 ^a ± 0,21	4,11	128	5,08 ^a ± 0,24	4,72	120	4,81 ^b ± 0,53	11,02	p<0,0001
ST (g/dL)	144	14,55 ^a ± 1,48	10,17	128	13,88 ^b ± 1,34	9,65	120	13,93 ^b ± 1,81	12,99	p<0,002
NCS (cel/mL)	144	29000 ^a		128	29000 ^a		120	26000 ^a		p>0,5

Letras distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si.

N – número de amostras, pH – potencial hidrogeniônico, EC – eletrocondutividade, ST – sólidos totais, NCS – número de células somáticas, CV – coeficiente de variação. * Valores expressos pela mediana.

TABELA 5 – Valores de pH, eletrocondutividade, cloreto, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e NCS do leite de búfalas sadias criadas em São Paulo. Distribuição segundo as fases de lactação

GRUPOS ETÁRIOS	pH	EC (MS/CM)	Cloreto (mg/dL)	Gordura (g/dL)	Proteína (g/dL)	Lactose (g/dL)	ST (g/dL)	NCS
Até 4,5 anos	6,90 ^{ab} ± 0,13	3,95 ^c ± 0,51	20,30 ^b ± 3,41	3,64 ^a ± 1,34	4,33 ^a ± 0,49	5,10 ^a ± 0,38	14,25 ^a ± 1,47	36000 ^b
5 a 10 anos	6,86 ^b ± 0,12	4,21 ^b ± 0,60	22,06 ^{ab} ± 7,97	3,40 ^a ± 1,47	4,19 ^a ± 0,55	4,96 ^{ab} ± 0,44	13,65 ^a ± 1,66	54500 ^b
+ 10 anos	6,92 ^a ± 0,18	4,55 ^a ± 0,99	25,00 ^a ± 10,46	3,73 ^a ± 1,50	4,30 ^a ± 0,31	4,84 ^b ± 0,45	13,98 ^a ± 1,74	95500 ^a
Significância	p<0,04	p<0,0001	p<0,007	p>0,5	p>0,2	p<0,003	p>0,08	p<0,0001

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

EC – eletrocondutividade; NCS – número de células somáticas; ST – sólidos totais.

TABELA 6 – Valores de pH, eletrocondutividade, cloreto, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e número e NCS no leite de búfalas sadias, São Paulo. Distribuição segundo a idade dos animais

VARIÁVEIS	ESCORES DO CMT			
	NEGATIVO	TRAÇOS	1 +	2 +
pH	6,88 ^b ± 0,12	6,88 ^b ± 0,14	6,99 ^a ± 0,28	6,96 ^{ab} ± 0,28
Eletrocondutividade (mS/cm)	4,08 ^c ± 0,69	4,72 ^b ± 0,49	5,15 ^b ± 1,18	5,81 ^a ± 1,18
Cloreto (mg/dL)	21,36 ^c ± 7,77	27,11 ^b ± 6,90	31,00 ^a ± 11,28	37,36 ^a ± 11,84
Gordura (g/dL)	3,93 ^a ± 1,51	3,07 ^a ± 1,44	3,77 ^a ± 1,60	3,48 ^a ± 1,35
Proteína (g/dL)	4,16 ^a ± 0,54	4,19 ^a ± 0,16	4,16 ^a ± 0,54	4,36 ^a ± 0,49
Lactose (g/dL)	5,01 ^a ± 0,36	4,72 ^{ab} ± 0,30	4,62 ^b ± 0,46	3,97 ^c ± 0,76
Sólidos totais (g/dL)	14,32 ^a ± 2,17	12,96 ^a ± 1,68	13,49 ^a ± 1,74	15,08 ^{###} ± 8,94
NCS (cel/mL)	30.500 ^c	149.000 ^b	451.000 ^a	930.000 ^{a##}

Letras distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si e os sinais #, ##, ###, #* e #** correspondem aos níveis de significância p<0,009, p<0,03, p<0,2, p<0,0001 e p>0,6, respectivamente.

TABELA 7 – Valores de pH, eletrocondutividade, cloreto e (NCS) do leite de búfalas sadias, São Paulo. Distribuição segundo o CMT

Os resultados obtidos do pH, eletrocondutividade, teores de cloreto, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e número de células somáticas, distribuídos nas diferentes fases de lactação, são apresentados na **Tabela 5**. A partir desses resultados, pode-se verificar que a eletrocondutividade, teores de cloreto e proteína aumentaram com a evolução da lactação. Fato inverso ocorreu com os teores de gordura, lactose e sólidos totais, que diminuíram com o progredir da lactação. Os valores médios de eletrocondutividade, de 4,11 mS/cm obtidos no presente estudo, foram semelhantes aos verificados por Silva et al. (1996), ao trabalharem com búfalas das raças Surti e Lankan, encontrando média de 4,16 mS/cm.

A análise dos resultados obtidos permitiu observar que os teores de gordura, lactose e sólidos totais foram significativamente maiores na fase inicial da lactação do que os obtidos em fases mais adiantadas da lactação. Ademais, os valores médios de proteína e lactose são equivalentes aos relatados por Cerón-Muñoz et al. (2002); Dubey et al. (1997); Franciscis & Di Paolo (1994); Furtado (1980); Guarino (1996); Macedo et al. (2001); Mesquita et al. (2002); Nader Filho et al. (1984) e Toledo et al. (1998).

Os elementos constituintes do leite de búfalas sadias criadas no Estado de São Paulo apresentaram correlação intensamente positiva e significativa para os seguintes parâmetros: eletrocondutividade/teor de cloreto; eletrocondutividade/taxa de lactose; teor de cloreto/lactose; concentração de gordura/sólidos totais. As correlações foram medianamente positivas e significativas para os parâmetros: número de células somáticas/eletrocondutividade; número de células somáticas/teor de lactose; concentrações de lactose/proteína; pH/eletrocondutividade; e pH/teor de cloreto. Não foi verificada influência na contagem de células somáticas (CCS) com os teores de gordura e proteína no leite de búfalas, fato esse concordante com os encontrados por Barreto et al. (2010).

Em relação aos valores de normalidade dos parâmetros físico-químicos e celulares do leite e o aumento da idade de búfalas criadas em São Paulo (**Tabela 6**), pode-se inferir que a eletrocondutividade, os teores de cloreto e o número

de células somáticas aumentaram, significativamente, com o aumento da idade das búfalas. Essa ocorrência tem ligação direta com o número maior de isolamentos bacterianos com o decorrer das sucessivas lactações e, portanto, com o avançar da idade dos animais, tal como discutido acima. Porém, os teores de gordura, proteína e sólidos totais não se alteraram com o evoluir da idade dos animais. Fato inverso foi demonstrado em trabalho na região do Alto São Francisco realizado por Amaral (2005), que verificou em búfalas multíparas, portanto mais velhas, valores de gordura aumentados em relação àquelas mais novas, de primeira lactação.

Na observação dos constituintes físico-químicos e do escore do CMT (**Tabela 7**), foi verificada intensa relação positiva nos resultados de eletrocondutividade e teores de cloreto com o aumento do escore do CMT. Entretanto, os teores de gordura, proteína e sólidos totais se apresentaram constantes e independentes do CMT. Essa ocorrência pode ser explicada pelo fato do número de células somáticas ter se apresentado baixo, não alterando a atividade da célula do parênquima mamário. O número médio de células somáticas (30.500 cel/mL) se mostrou menor que o verificado por Singh e Ludri (2001) com (100.000 cel/mL) quando o CMT se apresentou negativo. Amaral et al. (2004), em estudo realizado em Minas Gerais, evidenciaram média de 24.000 cel/mL, valor esse coincidente ao encontrado nesse trabalho de pesquisa.

Os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e número de células somáticas verificados quando as amostras de leite foram colhidas antes ou após a ordenha são apresentados na **Tabela 8**. A avaliação dos resultados obtidos em amostras de leite de búfalas sadias demonstrou significativa influência do momento da ordenha nos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, como também sobre o número de células somáticas. Observou-se que os teores de gordura, sólidos totais e número de células somáticas foram significativamente maiores nas amostras colhidas após a ordenha. Tal observação constitui um alerta aos clínicos veterinários dedicados ao controle das enfermidades da

MOMENTO DA ORDENHA	Gordura (g/dL)	CV (%)	Proteína (g/dL)	CV (%)	Lactose (g/dL)	CV (%)	Sólidos Totais (g/dL)	CV (%)	NCS (cel/mL)
Antes	3,90 ^b ± 1,51	38,72	4,12 ^a ± 0,51	12,38	5,02 ^a ± 0,35	6,97	14,18 ^b ± 1,56	11,00	29000 ^b
Depois	8,90 ^a ± 2,73	30,67	3,67 ^b ± 0,59	16,08	4,64 ^b ± 0,50	10,77	18,31 ^a ± 2,99	16,33	56000 ^a
Significância	p<0,0001		p<0,0001		p<0,0001		p<0,0001		p<0,0001

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

CV – coeficiente de variação, NCS – número de células somáticas

TABELA 8 – Valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e número de NCS do leite de búfalas sadias, São Paulo. Distribuição segundo o momento de ordenha. Valores expressos em termos médios

mama de búfalas, pois, caso o exame clínico seja realizado em período pós-ordenha, os resultados devem ser interpretados com atenção, utilizando como referência os valores obtidos nesse momento.

Conclusão

A partir do presente trabalho, pode-se considerar a eletrocondutividade, os teores de cloreto e lactose, a celularidade e o isolamento microbiológico positivo como elementos significativos na avaliação das condições de sanidade da glândula mamária das búfalas.

A associação das manifestações sintomáticas da glândula mamária aos resultados dos exames complementares de amostras de leite permitiria ao clínico veterinário o diagnóstico das mamites das búfalas.

A análise estatística dos achados do estudo permitiu a obtenção de valores que possam nortear a avaliação do pH, eletrocondutividade, teores de cloreto, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e número de células somáticas no leite de búfalas.

A regionalização de valores de referência, evidenciando e particularizando diferenças presentes nos rebanhos produtores de leite auxiliam a verificação do estado de higidez da glândula mamária das búfalas e da qualidade do leite.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento deste projeto de pesquisa (Processo 00/04113-4).

Referências

- AMARAL, F. R. **Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas**. 2005. 46f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R.; SOUZA, G. N. Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Revista do Instituto Cândido Tostes*, n. 59, p. 37-41, 2004.
- ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.
- BARRETO, M. L. J.; RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; BEZERRA, C. C.; MEDEIROS, H. R.; OLIVEIRA, J. P. F.; ANDRADE, K. D. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (CCS), a produção, o teor de gordura do leite, proteína e extrato seco total do leite bubalino. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v. 6, n. 2, p. 47-53, 2010.
- CERÓN-MUÑOZ M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MONÓZ-BERROCAL, M.; JURADO-GÁMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *Journal of Dairy Science*. v. 85, n. 11, p.2885-2889, 2002.
- COELHO, K. O.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L. D.; CORASSIN, C. H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas por meio de analisadores automatizados. *Ciência Animal Brasileira* v. 5, n. 3, p. 167-170, 2004.
- COSTA, E. O.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; GARINO JR, F.; HORIUTI A, M.; BARUSELLI, P. S. Mastite bubalina: etiologia, índices de mastite clínica e subclínica. *Napgama*, n. 1, v. 3, p. 13-15, 2000.
- COSTA, E. O.; GARINO JR., F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J.; VEZON, P.; GABALDI, S. H.; BENITES, N. R.; BARISELLI, P. S.; PASKE, A. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997. Italy. *Proceedings...* Caserta: International Buffalo Federation, 1997a.p. 631-634.
- COSTA, E. O.; GARINO, JR. F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R. VEZON, P.; BARISELLI, P. S.; PASKE, Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds (*Bubalus bubalis*). in the Vale do Ribeira (Ribeira River Valley) São Paulo Brazil. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997. Italy. *Proceedings...* Caserta: International Buffalo Federation, 1997b. p. 635-638..
- DELLA LIBERA, A. M. M. P. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas com alta contagem de células somáticas**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998..
- DUBEY, P. C. Factors affecting composition of milk of buffaloes. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 67, n.9, p.802-804, 1997.
- FRANCISCIS, G.; DI PALO, R. Buffalo milkproduction. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 1994. p. 137-146.
- FURTADO, M. M. Protein content in buffalo's milk and its titratable acidity. *Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes*, v. 35, n. 211, p. 23-9, 1980.
- GUARINO, A., FUSCO, G., FENIZIA, D.; MEROLA A.; ROMANO M. Indagini chimiche e microbiologiche sul latte bufalino in provincia di Caserta. *Veterinária Italiana*, v. 32, n. 20, p.35-39, 1996.
- HARMON, R. J., EBERHART, D. E., JASPER, B. E., LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. 1990. **Microbiological procedures for the diagnosis os bovine udder infections - National Mastitis Council**. 3ªed. Arlington: National Mastitis Council.
- JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R. B.; CORREA, R. C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do Leite de Búfalas Murrah. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.
- MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção de leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 3, p.1084-1088, 2001.
- MESQUITA, A. J.; TANEZINI, C. A.; FONTES, I. M.; PONTES, I. S.; ROCHA, J. M.; SOUZA, J. T.; D'ALESSANDRO, W. T. **Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás/CEGRAF. 2002. 75 p.
- NADER FILHO, A.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JUNIOR. Influência do teor de proteínas totais na acidez e pH do leite de búfalas. *Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes*, v. 39, n. 231, p. 25, 1984
- PATEL, D. A.; SILVA, C. V.; SANNABHADTI, S. S. Sources of microbial contamination of raw milk. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 46, n. 2, p.:67-70, 1993..
- PATIÑO, E. M. Leite de búfalas. In: JORGE, .A. M.; COUTO, A. G.; CRUDELI, G. A.; PATIÑO, E. M. **Produção de búfalas de leite**. Botucatu: FEPAF, 2011a. p. 79-108.
- PATIÑO, E. M. Leite de búfalas. In: JORGE, .A. M.; COUTO, A. G.; CRUDELI, G. A.; PATIÑO, E. M. **Produção de búfalas de leite**. Botucatu: FEPAF, 2011b. p. 91-92.
- RANUCCI S, C.; FRUGANTI, G.; VALENTE, C.; TESEI, B.; TULLIO, S. Sul valore diag-

- nostico di alcune prove di laboratorio nella mastite subclinica della bufala. **Selezione Veterinaria**, v. 29, p. 495-506, 1988.
25. SAINI, S. S.; SHARMA, J. K.; KWATRA, M. S. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossebred cows and buffaloes in Punjab. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 47, p. 103-196, 1994.
26. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 221 p.
27. SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.
28. SENO, L. O.; CARDOSO, V. L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2016-2022, 2007.
29. SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p 133-137, 1994.
30. SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T.; AMBAGALA, A. P. N.; COORAY, R. Markers of inflammation in buffalo milk. In: REGIONAL SYMPOSIUM, 1995, Peradeniya. **Proceedings...** Sri Lanka, 1996.p. 403-414.
31. SINGH, M.; LUDRI, R. S. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity, and season. **Asian-Australian Journal Animal Science**, n. 14, p. 189-192, 2001.
32. SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6. ed. Ames: Iowa State University Press, 1967. 593 p.
33. TOLEDO, T. L.; TONHATI, H.; OLIVEIRA, J. F. S. Produção e composição físico-química do leite de búfalas da região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1998. p. 282-284.
34. VIANA, R. B.; CARDOSO, E. C.; GOUVEIA, I. M.; RESENDE, M. L. G. MONTEIRO, B. M.. ARAÚJO, C. V. Avaliação da eficiência do Somaticell® para o diagnóstico da contagem indireta de células somáticas no leite de búfalas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 1, p.24-30, 2010.
35. VIANNI, M. C.; NADER FILHO, A.; ROSSETTI, D. J. G.; LONGHI, J. L.; SICHER, M. Eficiência do *California Mastitis test* (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 3-4, 1990.]

A incidência do Botulismo no Brasil, entre 1999 e 2008

Botulism incidence in Brazil between 1999 and 2008

Resumo

O Botulismo alimentar é uma doença neuroparalítica grave causada pela ingestão de neurotoxinas presentes em alimentos contaminados com a bactéria *Clostridium botulinum*, frequentemente relacionada a diversos tipos de alimento como embutidos ou enlatados de origem animal ou vegetal. Na série histórica no Brasil, entre 1999 e 2008, ocorreram 105 casos suspeitos, dos quais 39 foram confirmados e 13 vieram a óbito.

Summary

The food botulism, a severe neuroparalytic disease caused by ingestion of neurotoxins found in foods contaminated with the bacterium *Clostridium botulinum*, often related to various types of food such as embedded or canned vegetable or animal origin. In the historical series in Brazil between 1999 and 2008 occurred 105 suspected cases of which 39 were confirmed and 13 deaths occurred.

Pedro Vieira Borges Salgueiro ¹

✉ salgueiro7@gmail.com

Prof^a. Dr^a. Paula Spinha de Toledo
Domingues ²



Palavras-chave

Botulismo; Botulismo Alimentar; Incidência;
Conserva de Alimentos.

Keywords

Botulism; Food Borne Botulism; Incidence;
Canned Food.

O Botulismo é uma intoxicação alimentar provocada pelo *Clostridium botulinum*, bactéria gram-positiva de extrema gravidade, caracterizada por distúrbios digestivos e neurológicos, devido à ingestão de diversos tipos de alimentos, embutidos ou enlatados, de origem animal ou vegetal, insuficientemente esterilizados ou conservados em substrato com pH superior a 4,6 (BRASIL, 2006; SILLOS & FAGUNDES, 2007). Nesses alimentos, há condições adequadas para o agente produzir uma potente neurotoxina capaz de levar os intoxicados ao óbito. Os primeiros sintomas são apatia, falta de apetite, cefaleia e, a partir destes, começam os sintomas neurológicos como vertigem, ptose palpebral, disfagia e paralisia respiratória, levando ao óbito (GERMANO, 2003; ESTADOS UNIDOS, 2004; ESTADOS UNIDOS, 2010). O diagnóstico é baseado nos sintomas e exames neurológicos, o prognóstico depende da extensão das lesões e o tratamento se divide em dois momentos: tratamento de suporte e tratamento específico (BEER, 1999; GERMANO, 2003; HOBBS, 1998; BRASIL, 2006). A prevenção é o aspecto epidemiológico da doença mais importante, e é feita principalmente através da sensibilização da população. O controle é feito por meio da investigação epidemiológica, do correto diagnóstico e do tratamento dos pacientes (BERMUDEZ, 2007; ATAÍDE, 2006; BERNADETTE, 2002; GERMANO, 2003; ADAMS, 2002; BRASIL, 2006). Entre 1999 e 2008, houve 105 casos suspeitos, dos quais 39 foram confirmados, ocorrendo 13 óbitos, 37 de Botulismo alimentar, um de Botulismo por fermentos e um de

1 Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Anhembi Morumbi – São Paulo.

2 Universidade Anhembi Morumbi – São Paulo.

Botulismo intestinal. A faixa etária mais acometida foi a de 10 a 49 anos de idade, e a região Sudeste foi a mais afetada, com 18 casos, onde os produtos suínos foram os mais envolvidos, com 15 casos (BRASIL, 2011).

Desenvolvimento

O agente etiológico do Botulismo são as toxinas do *C. botulinum*, que são bacilos gram-positivos, formadores de esporos e anaeróbios estritos capazes de produzir toxinas, de natureza proteica (BERNADETTE, 2002).

Existem oito tipos de toxinas, classificados como A, B, Ca, Cb, D, E, F e G (GERMANO, 2003). As do tipo A, B, E e F são patogênicas para o homem, sendo o tipo A o mais tóxico e o mais frequente no homem, embora o tipo B seja o mais difundido (BRASIL, 2006; BEER, 1999; BERMUDÉZ, 2007; GERMANO, 2003). O tipo E, bastante tóxico para o homem, encontra-se nos peixes e a intoxicação é decorrente, quase que exclusivamente, dos hábitos de ingestão de peixe cru ou mal cozido (GERMANO, 2003).

As condições ideais para que a bactéria assuma a forma vegetativa, produtora de toxina, são: anaerobiose, pH alcalino ou próximo do neutro (4,8 a 8,5), atividade de água de 0,95 a 0,97 e temperatura ótima de 37°C. Os tipos A e B se desenvolvem em temperaturas próximas das encontradas no solo (acima de 25°C e até 40°C), enquanto o tipo E é capaz de proliferar a partir de 3°C (BRASIL, 2006; BEER, 1999).

Existem três formas de Botulismo: Botulismo clássico (alimentar), causado pela ingestão de alimentos contendo neurotoxinas; Botulismo de lesões (*wound botulism*), doença infecciosa causada pela proliferação e consequente liberação de toxinas em lesões infectadas com *C. botulinum*; e o Botulismo infantil, que também é uma doença infecciosa causada pela ingestão de esporos de *C. botulinum*, com a produção da toxina no intestino de crianças com menos de um ano de idade (BERNADETTE, 2002; ESTADOS UNIDOS, 2010). As três formas da doença têm sinais clínicos muito semelhantes. (BERNADETTE, 2002; ESTADOS UNIDOS, 2010).

Existem dois grupos mais afetados pela contaminação do *C. botulinum*, que são as crianças com menos de um ano, por não terem desenvolvido a imunidade necessária para que sejam protegidas, e os idosos e imunodeprimidos, por possuírem as barreiras imunológicas deficientes (SILLOS & FAGUNDES, 2007). A microbiota competitiva do aparelho digestório humano tem um papel protetor de extrema importância na inibição da multiplicação e da produção de toxinas de *C. botulinum* (BERNADETTE, 2002).

Dependendo do tipo de toxina envolvida, seguem os principais distúrbios do sistema nervoso: oculares (miíriase, diplopia, ptose e estrabismo); secretórios (secura da boca, constrição faríngea, ausência de sudorese); e motores progressivos (diminuição da motricidade da língua, mastigação e deglutição difíceis, enfraquecimento dos músculos respiratórios e do diafragma, paralisia dos intestinos, da bexiga e dos esfíncteres).

O paciente mantém a percepção sensorial apesar da gravidade dos sintomas nervosos. Nos casos fatais, a morte pode ocorrer em três a dez dias, em 50% a 60% dos doentes, por paralisia do centro respiratório. Nos casos com remissão dos sintomas, podem persistir paralisias parciais por meses (GERMANO, 2003; HOBBS, 1998; ESTADOS UNIDOS, 2004; ESTADOS UNIDOS, 2010). O Botulismo de origem alimentar tem um período de incubação que, em geral, varia de 12 a 36 horas, dependendo da quantidade de toxina ingerida (BERNADETTE, 2002; ADAMS, 2002).

O Botulismo alimentar é caracterizado por ser súbito e progressivo. Os primeiros sinais e sintomas podem ser gastrointestinais e/ou neurológicos. Os sintomas neurológicos podem ser inespecíficos, tais como cefaleia, vômito, fraqueza, vertigem e tontura, e quanto maior a concentração da toxina no alimento ingerido, menor será o período de incubação. No Botulismo por fermentos, o quadro clínico é semelhante ao do Botulismo alimentar, mas são raros os sinais e sintomas gastrointestinais, podendo ocorrer febre decorrente de contaminação secundária do fermento. O período de incubação pode variar de 4 a 21 dias, sendo a média de 7 dias. Já no Botulismo intestinal, nas crianças, o aspecto clínico varia de quadros com constipação leve até síndrome de morte súbita. No início, ocorre constipação e irritabilidade, seguidas de sintomas neurológicos, caracterizados por dificuldade de controle dos movimentos da cabeça, sucção fraca, disfagia, choro fraco, hipoatividade e paralisias bilaterais descendentes, que podem evoluir para comprometimento respiratório. Os casos leves são caracterizados por dificuldade alimentar e fraqueza muscular discreta. É impossível saber o período de incubação, devido à impossibilidade de se determinar o momento da ingestão dos esporos (BRASIL, 2006; GERMANO, 2003; ESTADOS UNIDOS, 2004; ESTADOS UNIDOS, 2010).

Não existe nenhuma lesão anatomopatológica que seja específica da doença. O mais comum é a congestão sanguínea em todos os órgãos, edema pulmonar e repleção da bexiga urinária (BEER, 1999).

O Botulismo é uma pandemia de modo irregular, cuja principal fonte de contaminação é o alimento ingerido, e ocorre com mais frequência nos meses de verão,

quando as temperaturas se encontram entre 22°C e 37°C e a bactéria prolifera nos alimentos (BÉRMUDEZ, 2007; BRASIL, 2006).

Os reservatórios são os mamíferos, as aves e os peixes. Estão envolvidos na cadeia de transmissão o solo e as águas, principalmente as estagnadas (HOBBS, 1998; BRASIL, 2006).

A contaminação dos alimentos dá-se por meio das fezes de animais, contato com o solo contaminado e até da própria água utilizada para sua higienização ou preparo (GERMANO, 2003; BRASIL, 2005; BRASIL, 2006).

Com relação à patogenia da doença, a toxina botulínica é absorvida no trato gastrointestinal ou no ferimento e dissemina-se via corrente sanguínea, desenvolvendo sua ação sobre as terminações nervosas colinérgicas do sistema nervoso periférico e autônomo. A toxina se liga aos nervos centrais e periféricos, sendo uma ligação seletiva e saturável. No início, afeta os centros motores da medula e progride atacando as sinapses das fibras musculares periféricas. A toxina inibe a acetilcolinesterase, paralisando os nervos motores e, por fim, o nervo frênico (BEER, 1999; BÉRMUDEZ, 2007; ADAMS, 2002). A recuperação do paciente depende da formação de novas terminações neuromusculares, por isso é bastante prolongada, variando de um a 12 meses (BRASIL, 2006).

Os alimentos mais envolvidos em surtos de Botulismo são os embutidos, tais como salsichas, presuntos, chouriços e patês, assim como os derivados de leite, enlatados, queijos, produtos fermentados e peixes em conserva ou defumados, entre os quais todos são passíveis de provocar intoxicação. Produtos vegetais, como palmito, espinafre, aspargos, cogumelos, milho, vagens, figos, azeitonas e ervilhas, também podem estar envolvidos nesses surtos (GERMANO, 2003; BRASIL, 2006). Deve-se dar preferência às conservas industriais, pois as conservas caseiras ou artesanais constituem grande risco para a saúde da população (GERMANO, 2003; ADAMS, 2002).

As pessoas, independente da idade e do estado de saúde, estão expostas à doença desde que sejam contaminadas pelas toxinas do *C. botulinum*. A dose infectante é ínfima, de 0,1 mg a 1,0 mg (GERMANO, 2003).

As toxinas do Botulismo têm uma ação parecida com a do veneno da cobra cascavel ou a da estricnina, atacando o sistema nervoso (HOBBS, 1998).

A pesquisa para o diagnóstico da toxina botulínica nos alimentos suspeitos é o procedimento mais correto, mas na prática é difícil porque ou não há sobras ou foram para o lixo. Deve-se colher soro sanguíneo, fezes e vômito para pesquisa da toxina (GERMANO, 2003; HOBBS, 1998; BRASIL, 2005; BRASIL, 2006). Os sintomas clínicos e a anamnese constituem importantes

referências acerca da existência do Botulismo, mas só se pode comprová-lo com a identificação da toxina no alimento ou conteúdo gástrico. A determinação do título de toxina é realizada mediante o teste feito em camundongos e cobaias (BEER, 1999; BRASIL, 2006).

O controle e a prevenção consistem em evitar a germinação, multiplicação e a consequente produção da toxina do *C. botulinum* nos alimentos. O pH ácido em baixa atividade de água e teores de umidade inferiores a 30% ajudam nesse controle, assim como a conservação dos alimentos sob refrigeração ou congelamento ou mesmo o uso de nitratos e nitrito, salga, secagem e fermentação. A esterilização é o meio mais eficaz para inativar os esporos e toxinas do *C. botulinum*, utilizando-se aquecimento em temperatura de 121°C pelo menos por dez minutos. A população deve sempre ser orientada sobre o preparo, conservação e consumo adequado dos alimentos associados ao risco de adoecimento (GERMANO, 2003; ADAMS, 2002; BRASIL, 2005; BRASIL, 2006).

É preciso lembrar-se de que o congelamento e a refrigeração não têm qualquer efeito prático na destruição de células vegetativas, esporos ou neurotoxinas botulínicas (BERNADETTE, 2002). Para se evitar o Botulismo intestinal causado pelo mel, não se deve fornecer mel *in natura* ou xarope de milho para crianças com até um ano de idade (BERMUDÉZ, 2007; ATAÍDE, 2006).

O tratamento deverá ser feito em unidade de terapia intensiva (UTI), abrangendo os seguintes aspectos principais: administração da antitoxina botulínica, na tentativa de prevenir a progressão neurológica da doença; monitorização cardiorrespiratória; cuidado intensivo e meticuloso apropriado para uma doença paralítica de longa duração. O êxito no tratamento depende da precocidade do diagnóstico (BRASIL, 2006; BERMUDÉZ, 2007).

Deve-se coletar todas as amostras clínicas para exames diagnósticos antes de se iniciar o tratamento específico (BRASIL, 2005; BRASIL, 2006).

Série histórica

“A vigilância epidemiológica de Botulismo teve início oficial em 2002, no entanto, desde 1999 a Coordenação de Vigilância das Doenças de transmissã Hídrica e Alimentar (COVEH) realiza a vigilância desse agravo. Entre 1999 e setembro de 2008, foram notificados 105 casos suspeitos de Botulismo, dentre os quais 39 foram confirmados: 37 de Botulismo alimentar, um de Botulismo por ferimento e um de Botulismo intestinal. A taxa de letalidade nesse período foi de 33,3%” (BRASIL, 2011).

O total foi de 13 óbitos, conforme gráficos a seguir.

TIPOS DE BOTULISMO	Nº DE CASOS CONFIRMADOS
Botulismo Alimentar	37
Botulismo por Fermentos	1
Botulismo Intestinal	1
Total	39

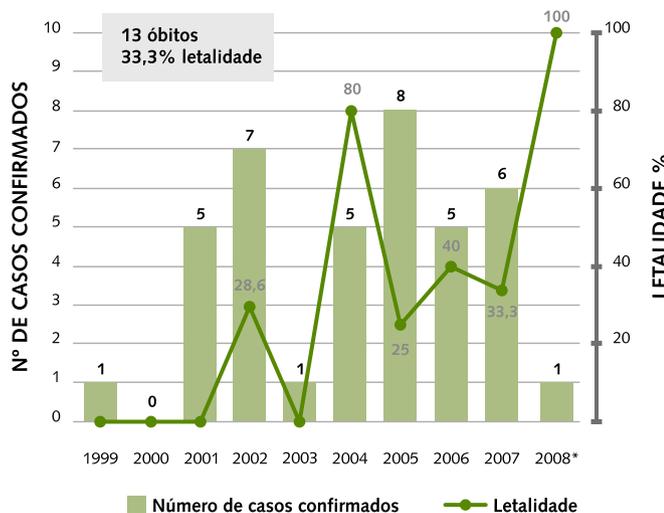
Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

TABELA 1 – Tipos de Botulismo



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

GRÁFICO 1 – Número de casos suspeitos e confirmados de Botulismo



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

GRÁFICO 2 – Números de casos e taxa de letalidade de Botulismo

A faixa etária mais acometida é a de 10 a 49 anos de idade, contrária ao texto que diz que são crianças e idosos (SILLOS; FAGUNDES, 2007).

FAIXA ETÁRIA	Nº DE CASOS	%
06 – 09 anos	4	11
10 – 20 anos	13	34
21 – 49 anos	13	34
50 – 79 anos	8	21
Total	38	100

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

TABELA 2 – Casos de Botulismo por faixa etária. Brasil, 1999-2008

A região Sudeste apresenta maior número de casos, 18, representando 46%.

REGIÃO	Nº DE CASOS	%
Sudeste	18	46
Nordeste	11	28
Centro-Oeste	8	25
Sul	2	21
Total	39	100

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

TABELA 3 – Casos por local de ocorrência. Brasil, 1999 a 2008

São os produtos suínos os mais envolvidos com 15 casos, representando 41%.

REGIÃO	Nº DE CASOS	%
Produtos suínos	15	41
Palmito	4	11
Torta de frango	8	21
Tofu	4	11
Peixe em conserva	1	2
Ignorado	5	14
Total	37	100

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

TABELA 4 – Casos de Botulismo alimentar por tipo de alimento. Brasil, 1999-2008

Conclusão

O Botulismo é um problema de saúde pública, em que o maior perigo de contaminação está nos alimentos preparados de forma artesanal, especialmente em conservas caseiras, que são imprópriamente manipuladas ou que sofreram tratamento térmico insuficiente para destruir as toxinas botulínicas. No entanto, pode ser

facilmente evitado através da sensibilização da população e das boas regras de higienização. Constatando-se que o número de casos de Botulismo no Brasil não é elevado, mas com grande letalidade, há tendência para diminuição, devido à produção de produtos industrializados. A doença ocorre mais na região Sudeste e envolve produtos suínos. 

Referências

- ADAMS, M. Botulismo. In: MOTARJEMI, Y. **Segurança básica dos alimentos para profissionais de saúde**. São Paulo: Roca, 2002. p. 94.
- ATAÍDE, J. **Botulismo com Enfoque no Consumidor**. Disponível em <http://www.portalsalgueiro.com.br/coluna_livre_joao_ataide/Botulismo_enfoque_consumidor_2006_12_04.htm>. Acesso em: 27 fev. 2011.
- BEER, J. Botulismo. In: _____ **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Roca, 1999. p. 255 – 260.
- BERMUDÉZ, J. **Botulismo**. 2007. Disponível em: <<http://www.santaelena.com.uy/HNImpimir.cgi?809,0>>. Acesso em: 28 fev. 2011.
- BERNADETTE, D. G. M. *Clostridium Botulinum*. In: LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 36-39.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília. Ministério da Saúde, 2005. p. 170-186.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância epidemiológica do Botulismo**. Brasília. Ministério da Saúde, 2006. p.88.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica do Botulismo**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Botulismo.ppt.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2011.
- ESTADOS UNIDOS. Centers for Disease Control and Prevention. **Botulism**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/botulism/>>. Acesso em: 02 Mar. 2011.
- ESTADOS UNIDOS. Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses: **Botulism Poisoning**. 2004. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama1/pub/upload/mm/36/2004_food_botulism.pdf>. Acesso em: 02 Mar. 2011.
- ESTADOS UNIDOS. **Public health fact sheet: Botulism**. Massachusetts Department of Public Health. 2010. Disponível em: <<http://www.mass.gov/EeoHhs2/docs/dph/cdc/factsheets/botulism.pdf>>. Acesso em: 02 Mar. 2011.
- GERMANO, P.M.L. *Clostridium Botulinum*. In: GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Varela, 2003. p.225 – 230.
- HOBBS, B.C. *Clostridium botulinum*. In: ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico – sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. p.28;118;231-232.
- RIEDEL, G. Botulismo. In: _____ **Controle sanitário dos alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1992. p.68.
- SILLOS, M. D; FAGUNDES, U. N. **Doenças veiculadas por alimentos – intoxicação alimentar**. 2007. Disponível em: <<http://egastroped.com.br/sept04/intoxica.htm>>. Acesso em: 01 mar. 2011.

Raiva: uma doença antiga, mas ainda atual

Parte 1

Rabies: an antique disease, but still current

Resumo

O objetivo principal deste manuscrito é fornecer informações técnicas e científicas sobre a raiva aos estudantes de medicina veterinária, veterinários e outros profissionais relacionados à saúde. Embora conhecida desde a antiguidade, atualmente ela é definida como uma zoonose negligenciada e permanece endêmica, especialmente em países em desenvolvimento, por causa de limitações financeiras e problemas de infraestrutura. Os morcegos hematófagos foram relatados como novos reservatórios da raiva na América Latina e no Caribe no início do século XX, causando prejuízos econômicos na pecuária e mortes humanas, no entanto o mundo ainda está surpreso por causa dos lissavírus em morcegos não hematófagos na África, Oceania e Eurásia. Os vírus da raiva e os vírus relacionados à raiva, coletivamente denominados de lissavírus, podem ser distinguidos pela caracterização molecular em vários genótipos distintos, no entanto somente os vírus do genótipo 1 são costumeiramente referidos como vírus da raiva, enquanto todos os outros são chamados de lissavírus. Na taxonomia viral, o uso de técnicas moleculares disponíveis na atualidade possibilitou a inclusão de novas espécies-membros no gênero *Lyssavirus* e revelou a existência de variantes distintas dos vírus da raiva distribuídas entre diferentes espécies animais em diferentes regiões do mundo. A colonização europeia da África, Ásia e do Novo Mundo teve papel importante na disseminação da "linhagem cosmopolita" do vírus da raiva através de cães que viajavam com os conquistadores e colonizadores. O vírus, uma vez estabelecido nas populações de cães, subsequentemente pode ter sido transmitido para novas espécies de reservatórios silvestres e evoluiu para distintas linhagens devido às mutações acumuladas ao longo dos séculos. Os hospedeiros reservatórios da raiva no mundo variam conforme as localizações geográficas.

Summary

The main objective of this manuscript is to provide students of veterinary medicine, veterinarians and other health-related professionals with scientific and technical information on rabies. Although the disease is known since antiquity, it is now defined as a neglected zoonosis and it remains endemic especially in developing countries, because of financial limitations and problems of infrastructure. The vampire bats were reported as new reservoirs of rabies in Latin America and Caribbean islands in the early 20th century provoking economic losses in livestock and human deaths, but still the world is astonished because of the lyssaviruses in non hematophagous bats in Africa, Oceania, and Eurasia. Rabies and the rabies-related viruses, collectively known as lyssaviruses, can be distinguished by molecular characterization into several distinct genotypes but only the genotype 1 viruses are customarily known as rabies viruses, whereas all others are referred to as lyssaviruses. In virus taxonomy, the use of the molecular techniques now available has augmented the species members of the genus *Lyssavirus* and revealed the existence of distinct variants of rabies viruses distributed among different animal species in different regions of the world. The European colonization of Africa, Asia and the New World played a significant role in the dispersion of the "cosmopolitan lineage" of the rabies virus through infected dogs traveling with the conquerors and colonizers. Rabies virus, once established in the dog populations, may then have been transmitted into new wildlife host reservoirs and evolved into distinct strains due to accumulated mutations through centuries. The reservoir hosts of rabies in the world differ according to the geographic locations.

Flávia Morato
Cássia Yumi Ikuta
Fumio Honma Ito

Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo – FMVZ/USP
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária, São Paulo-SP
CEP: 05508-270
e-mail: flamora@hotmail.com



Palavras-chave

Raiva, Distribuição, Vírus da raiva, Taxonomia, Reservatórios.

Keywords

Rabies, Distribution, Rabies virus, Taxonomy, Reservoirs.

A raiva é uma antropozoonose causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, caracterizada em animais e no ser humano por uma encefalite aguda fatal (ACHA; SZYFRES, 2003), ou “quase sempre fatal” (NILSSON, 1970; BELL et al., 1971) nos animais e “quase invariavelmente fatal” no ser humano (MACHADO, 1996).

O termo *Hidrofobia* é utilizado para designar a doença no ser humano (WILKINSON, 2002). No cão, popularmente é denominada de doença de “cachorro louco” e, em bovinos, como “raiva paralítica” ou “doença paresiante” ou ainda “mal das cadeiras”, especialmente na América Latina (BAER, 1991).

A doença foi também denominada de “reemergente” ou “emergente” (WHO, 1995) ou como “doença zoonótica negligenciada” (WHO, 2010). O *Centers for Disease Control – CDC* (2010), de Atlanta, Georgia, EUA, define a raiva como uma doença prevenível com uso de vacinas. Em princípio, essa é uma doença mantida e perpetuada na natureza, principalmente pelos animais mamíferos carnívoros e pelos morcegos de diferentes hábitos alimentares, conhecidos como “reservatórios”, “vetores” ou ainda “hospedeiros amplificadores” (VAN DER MERWE, 1982; FIELD et al., 2001).

Histórico

A raiva é temida desde a antiguidade em razão da sua natureza violenta, tanto em animais como no ser humano. O primeiro registro escrito aparece no Código de Eshnunna (cidade da antiga Mesopotâmia, perto de Bagdá, atual Iraque) de 1930 a.C: *o proprietário de um cão que provocasse a morte de uma pessoa por raiva era multado pesadamente pelos legisladores* (BLANCOU, 2004). O temor causado pela raiva transmitida por cães, lobos e chacais era geral tanto nas populações urbanas como nas rurais. No entanto o número de vítimas humanas, quando comparado com outras doenças infecciosas, jamais mereceu a atenção dos demógrafos. Nos registros antigos, aparecem descrições de doenças no homem e nos animais que se assemelham às da raiva. Aparentemente, os sinais da raiva não sofreram alterações

por milhares de anos e as descobertas da epidemiologia molecular atestam que algumas dessas amostras de vírus teriam surgido há milhares de anos (BLANCOU, 2004). No tratado médico intitulado “*De Modo Prognosticandi et Curandi Febres*”, escrito por Frederico Grisogono, da Era da Renascença, e publicado em Veneza em 1528, consta que “*no caso da mordedura de um cão raivoso o processo leva vários meses, porque o veneno fica escondido no sangue por 3, 4, ou 5 meses até o coração tornar-se infectado. Quando o coração é afetado, seguem-se alterações abruptas e reações adversas – o paciente começa a perder sua memória, tem medo de água e morde com mordida venenosa e contagiosa, em consequência à agressão por um cão raivoso*” (MUTINELLI et al., 2004). Outro médico italiano, Girolamo Fracastoro, no seu tratado “*De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione*”, de 1530, descreveu que a doença era transmitida por meio da saliva de um animal infectado e o período de incubação não era inferior a 20 dias, em média de 30 dias, podendo estender-se de quatro a cinco meses ou, em raras vezes, de um a cinco anos (FERREIRA, 2005).

Na metade do século XVIII, a raiva urbana que acomete os cães surgiu na Europa, transmitida provavelmente por um animal silvestre (desconhecido), devido principalmente ao aumento da população de cães associado às grandes aglomerações humanas (ADAMSON, 1977). Os cães infectados com o vírus da raiva viajaram pelo mundo com os colonizadores europeus, disseminando o vírus para novos continentes e territórios. Subsequente à introdução da doença para novas áreas geográficas, o vírus pode ter sido transmitido para novas espécies de animais silvestres, o que, ao longo do tempo, possibilitou a evolução para novas estirpes de vírus. Os estudos moleculares sugerem que a Europa foi origem do vírus da raiva para o mundo, transmitido pelos cães, e o vírus foi denominado de “linhagem cosmopolita” (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Distribuição geográfica

África

É provável que a raiva esteja presente no Norte da África por milênios, uma vez que as civilizações humanas dessa região têm mantido comunicação com a região do Oriente Médio e Sul da Europa, onde a ocorrência da doença é conhecida desde a antiguidade. No entanto, a raiva transmitida pelos cães não era comum na África antes do estabelecimento de colonizadores europeus. Há registros de ocorrência da raiva canina na África do Sul entre 1770 e 1880. Entretanto as primeiras constatações

confiáveis aconteceram no final do século XIX, quando unidades do Instituto Pasteur foram estabelecidas na Argélia e na Tunísia, para a produção de vacina antirrábica destinada à imunização humana. O primeiro foco de raiva na África Subsaariana aconteceu em 1893, em Port Elizabeth, na costa Sudoeste da África do Sul, atingindo principalmente cães, gatos e herbívoros domésticos. A epidemia foi relacionada à importação de um cão da raça aire dale terrier da Inglaterra em 1892. A colonização europeia introduziu a raiva em toda a África Oriental e Ocidental, e os estudos de análises antigênicas e genéticas realizadas com as amostras de vírus isoladas da região Sul indicaram que há, pelo menos, dois biótipos distintos de raiva terrestre. Um biótipo é mantido em cães domésticos e canídeos silvestres, enquanto que o outro biótipo está associado com vários herpestídeos (*Cynictis penicillata*, *Galerella sanguinea*, *Suricata suricatta*) e viverrídeos (*Genetta genetta*) (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

América do Norte (Canadá e os Estados Unidos da América – EUA)

O primeiro registro da raiva canina nos EUA aconteceu no Estado da Virgínia em 1753 e no final do século atingiu a costa Oeste dos EUA. No Canadá, o primeiro caso humano foi registrado em 1819, tendo como transmissor uma raposa. O segundo caso ocorreu em Quebec, em 1839, associado a um cão. Casos esporádicos de raiva foram registrados ao Sul de Saskatchewan, provavelmente transmitidos por cães introduzidos do Estado de Dakota do Norte, EUA. Entre 1907 e 1945, foram relatadas epidemias de raiva em cães em Ontário e Quebec, com cães raivosos cruzando o Estado de Nova Iorque através da península do Niágara.

Em relação à raiva em animais silvestres, lobos e raposas com sinais de raiva foram encontrados em Ohio, no início de 1800. Em Massachusetts, as raposas já haviam sido incriminadas por causarem raiva em cães em 1812. As epidemias de raiva em animais silvestres envolviam principalmente as raposas-cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) e as raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*), no estado da Flórida entre 1953 e 1958. Outros canídeos silvestres, como as raposas do Ártico (*Alopex lagopus*), são importantes reservatórios no Norte do Continente Americano, conhecidas desde a época de 1800 na Groenlândia. A partir de 1907, casos de raiva em cães e em humanos foram registrados no Alasca e Norte do Canadá. Outros carnívoros silvestres, como o cangambá (*striped skunk*, *Mephitis mephitis*; spotted skunk, *Spirogale gracilis*, *Spirogale putorius*), são conhecidos como fontes de infecção da raiva ao ser humano, com o registro mais

antigo datado de 1826 no Estado da Califórnia, e desde 1940 o cangambá tem sido reconhecido como importante reservatório da raiva nos EUA e no Canadá. Em 1988, no Texas, na região de fronteira com o México, uma variante do vírus da raiva de cão foi responsável por uma epidemia em coiotes (*Canis latrans*).

A partir de 1947, surgiu uma variante do vírus da raiva em *raccoons* (*Procyon lotor*) no Estado da Flórida. Na década de 50 do século passado, a doença tornou-se endêmica na Costa Leste dos EUA e, em 1999, a epidemia atingiu os *raccoons* da Província de Ontário, Canadá, atravessando o rio Saint Lawrence (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

América Latina e Caribe

Anterior ao estabelecimento da colonização europeia, não há registros de ocorrência da raiva canina na América do Sul. No México, a doença era conhecida desde 1709, enquanto que, no Peru, foi reconhecida em 1803, e na Argentina, em 1806, em cães de caça introduzidos pelos soldados ingleses. O Uruguai registrou o primeiro caso em 1807, a Colômbia em 1810 e o Chile em 1835. No final do século XX, numerosos casos foram registrados no México e no Brasil, enquanto Equador e Colômbia registraram menor número de casos (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Um estudo sobre a história evolutiva do vírus da raiva canina no Brasil, realizado por meio de análise filogenética, indicou que a introdução do vírus ocorreu por volta do final do século XIX e no início do século XX, muito tempo depois do período de colonização europeia. No entanto, esse período corresponde ao de grande movimento migratório da Europa para o Brasil. O vírus da raiva posteriormente disseminou-se entre os animais carnívoros nativos durante o século XX, quando ocorreu o processo acelerado de desenvolvimento e urbanização no país (KOBAYASHI et al., 2011).

No Nordeste do Brasil, variantes do vírus da raiva canina foram isoladas de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) (CARNIELI et al., 2009) e raposinhas do Nordeste (*Dusicyon vetulus*) (BERNARDI et al., 2005), além de uma variante do vírus da raiva isolada de saguis (*Callithrix jacchus*) (BATISTA-MORAIS et al., 2000).

No Caribe, a raiva em cães era conhecida desde a época da colonização espanhola, como em Barbados (1741), Guadalupe (1776), República Dominicana e Jamaica (1783). O mangusto (*Herpestes auropunctatus*), introduzido da Índia nas décadas de 1870 e 1880 para combater os roedores nas plantações de cana-de-açúcar, inicialmente, na Jamaica e, posteriormente, em outras ilhas caribenhas, é considerado importante reservatório

para o vírus da raiva em Cuba, Granada, República Dominicana, Haiti e Porto Rico (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Oriente Médio, Ásia e Oceania

Uma revisão histórica da raiva menciona vários relatos de raiva em cães na Turquia, em 1586. Por volta de 1850, um incidente de raiva na cidade de Adália, território turco, envolveu um lobo raivoso que havia atacado mais de cem pessoas. Várias delas apresentaram quadro de raiva e morreram semanas depois. Na China, o primeiro relato da raiva humana aconteceu em 1857, em Hong Kong, causado por um cão inglês, e o segundo caso aconteceu em Cantão, no ano de 1860. Alguns nativos chineses e dois europeus que moravam próximo à cidade de Beijing morreram devido à hidrofobia causada por cães pertencentes aos europeus. Assim, a raiva passou então a ser conhecida como doença comum em cães criados pelos europeus (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Em 1893, na cidade de Nagasaki, Japão, ocorreu uma epidemia de raiva em um bairro habitado por estrangeiros, com 76 pessoas agredidas por cães e dez óbitos humanos. Na província de Aomori, Norte do Japão, um cão infectado procedente da Rússia agrediu 47 pessoas e 11 delas foram a óbito. O Japão registrou muitos casos de raiva a cada ano, pelo menos até 1906, e em 1923 ocorreu uma epidemia com 235 mortes humanas. Entre 1959 e 1968, foram considerados livres de raiva Hong Kong (último caso em 1955), Taiwan (desde 1959), Japão (1956), Malásia e Cingapura (último caso em 1953) (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Índia e Filipinas atualmente registram maior número de ocorrência de raiva na região Sudeste da Ásia. Outros países, como Tailândia e Indonésia, apresentam um número elevado de casos de raiva humana, assim como Sri Lanka e países da Indochina. Os reservatórios silvestres da raiva são virtualmente desconhecidos na Ásia e, em muitas regiões tropicais, o “raccoon-dog” (*Nictereutes procyonoides*) está migrando da Ásia Central para a Europa, representando uma séria ameaça à reintrodução do vírus da raiva para os cães e raposas da Europa Ocidental. Na Jordânia e Israel, lobos e chacais são os principais reservatórios do vírus da raiva (YAKOBSON; DAVID; ALDOMY, 2004), assim como no Irã, Afeganistão, Paquistão, Nepal e Índia (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Por outro lado, as ilhas do Pacífico, bem como a Austrália e a Nova Zelândia, têm conseguido manter-se livre da raiva. A Austrália apresentou um caso de raiva canina na Tasmânia em 1867 e, desde então, mantém-se livre da doença (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

Europa

Na Idade Média, na Europa e na região Mediterrânea, os reservatórios mais importantes eram os cães, lobos e chacais. Os primeiros perambulavam pelas ruas, por isso mesmo as amostras de vírus isoladas de cães e de outros animais foram denominadas de “vírus de rua” (*street virus* ou *virus de calle*). Nos países da Europa Ocidental, após o controle da raiva em cães, a doença passou a ocorrer quase exclusivamente em animais silvestres. O esforço para controlar a doença em animais mamíferos terrestres começou com ações voltadas para a população de raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*), com utilização de iscas contendo vacina antirrábica. Ao controlar a raiva em animais silvestres, alguns países da Europa Ocidental atingiram o status de países livres de raiva, como Holanda (1991), Suíça (1999), França (2000), Bélgica e Luxemburgo (2001), e República Tcheca (2004) (NADIN-DAVIS; BINGHAM, 2004).

A raiva em morcegos

No início do século passado, uma estranha doença acometia os bovinos e equídeos no Estado de Santa Catarina. Inicialmente, a doença foi diagnosticada como peste bovina. No entanto Carini (1911) foi o primeiro a diagnosticar raiva em um bovino morto por essa doença e mencionou em sua publicação que o morcego hematófago poderia ser o reservatório do vírus. Os pesquisadores da época, porém, consideraram o fato como “fantasia tropical”. Pouco tempo depois, Haupt e Rehaag (1925) confirmaram o envolvimento do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na transmissão da doença aos bovinos. Entre 1925 e 1929, foi registrada a ocorrência de botulismo em bovinos e poliomielite ascendente em seres humanos, na ilha de Trindade, no Caribe (CARNEIRO, 1936). Dois médicos americanos desfizeram o erro diagnóstico: a doença em bovinos e humanos tratava-se de raiva transmitida pelos morcegos hematófagos (PAWAN, 1936).

Nos episódios de Santa Catarina, o morcego frugívoro *Phyllostoma superciliatum*, (atualmente *Artibeus lituratus*) foi diagnosticado como positivo para raiva por Haupt e Rehaag, porém, aparentemente, o primeiro diagnóstico da raiva em morcego não hematófago foi realizado na ilha de Trindade, no morcego *Artibeus planirostris* (CARNEIRO, 1936). Investigações realizadas nos morcegos da ilha revelaram que 64 morcegos *D. rotundus*, quatro *Artibeus planirostris* e um morcego insetívoro *Diclidurus albus* estavam infectados com o vírus da raiva (PAWAN, 1936). Esses morcegos não hematófagos foram os únicos relatados com raiva antes dos anos 50 do século passado. No entanto esses achados não despertaram interesse nem mesmo contestações por pesquisadores, comparado ao que aconteceu com a descoberta da raiva nos

morcegos hematófagos (KING; HAAGSMA; KAPPELER, 2004). Porém, não foi o que aconteceu após o relato de um menino mordido por um morcego insetívoro (*Diclidus albus*) infectado pelo vírus da raiva no Estado da Flórida, EUA (VENTERS et al., 1954). O fato despertou interesse em outras partes do mundo e já no final da década de 1950 a presença do vírus da raiva em morcegos não hematófagos tinha sido confirmada na maioria dos países da América Central, América do Sul, América do Norte, África e Europa (BAER; SMITH, 1991).

Na Ilha de Lagos, Nigéria, África, foi isolado do morcego frugívoro *Eidolon helvum* um vírus sorologicamente semelhante ao vírus da raiva e, na África do Sul, de vários morcegos insetívoros, nas décadas de 1960 e 1970, denominados de vírus relacionados à raiva (rabies-related vírus), por causar uma doença muito semelhante à raiva (SHOPE et al., 1970).

No Brasil, o vírus da raiva foi isolado de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* e de numerosas espécies de morcegos de hábitos alimentares distintos (UIEDA et al., 1996). A lista de morcegos positivos para raiva, de 1996 a 2009, inclui 41 espécies pertencentes a 25 gêneros e três famílias: *Phyllostomidae* (43,9%), *Vespertilionidae* (29,3%) e *Molossidae* (26,8%) (SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010).

Todos os morcegos da Europa são de hábito insetívoro (famílias *Rhinolophidae*, *Vespertilionidae* e *Molossidae*) e o vírus da raiva foi isolado do morcego *Nyctalus noctula* na Iugoslávia, na década de 1950. Em Hamburgo, Alemanha, em 1954, um garoto foi mordido por um morcego não identificado. O cérebro do morcego foi negativo ao exame da raiva, porém foram encontrados numerosos corpúsculos de Negri nos cérebros de camundongos em sua primeira passagem. Nos 30 anos seguintes, os casos de raiva em morcegos foram diagnosticados intermitentemente em vários países europeus, porém os mesmos foram considerados como meras curiosidades científicas. Em 1985, na Dinamarca, país considerado livre da raiva, foi registrada uma epidemia de raiva em morcegos *Epitesicus serotinus* e, no final do século, a doença havia alcançado os morcegos de 17 países europeus, com mais de 600 casos. As espécies positivas para raiva incluem *Nyctalus noctula*, *Myotis myotis*, *E. serotinus*, *Myotis dasycneme*, *Pipistrellus nathusii*, *Vespertillio murinus*, *Myotis daubentonii*, e *Pipistrellus pipistrellus*. Porém, o grau de ameaça à saúde para os seres humanos e animais domésticos representado por esses morcegos insetívoros infectados continua desconhecido. Os morcegos positivos para a raiva foram encontrados na Polônia, Iugoslávia, Turquia, Tchecoslováquia, França, Espanha, Suíça, Eslováquia, Ucrânia, Reino Unido, Alemanha, Finlândia, dentre outros (KING, HAAGSMA; KAPPELER, 2004).

Na Austrália, o vírus foi isolado do morcego frugívoro *Pteropus alecto* e de outros morcegos insetívoros, a partir de 1996 (FRASER et al., 1996). Da Ásia Central à Sibéria, outros morcegos insetívoros foram identificados como positivos para o vírus da raiva. Atualmente, as características desses vírus são utilizadas como base para a classificação de espécies dentro do gênero *Lyssavirus* (FOOKS, 2004).

Ocorrência mundial

Existem poucos dados sobre a ocorrência da raiva no mundo. A raiva é endêmica em mais de cem países. Alguns países constituídos por ilhas e arquipélagos, como Islândia, Japão e Reino Unido, e outros países da Europa, como Bélgica, Finlândia, França, Grécia, Noruega, Portugal, Espanha, Suécia e Suíça, são considerados livres de raiva. Países do continente americano como Uruguai, Barbados, Jamaica e muitas ilhas do Caribe Inglês não têm mais notificado a ocorrência da raiva em seus territórios nos últimos anos (WHO, 2005). O Uruguai, que era considerado país livre da doença, em 2007, registrou uma epidemia de raiva em bovinos transmitida pelos morcegos *D. rotundus*, nos arredores de Tranqueras, departamento de Rivera, a 450 km ao Norte de Montevidéu e a 50 km da cidade brasileira de Santana do Livramento (UOL, 2007).

Há estimativas de que anualmente morrem de raiva 55.000 pessoas na África e na Ásia, especialmente em zonas rurais (intervalo de confiança, com $\alpha = 0,10$: 24.500 – 90.800), com uma estimativa de morte de 56% na Ásia e 44% na África. Somente na Índia, essa estimativa é de 30.000 mortes/ano, isso é, uma incidência anual de três mortes a cada 100.000 pessoas (WHO, 2005). A estimativa de 30.000 a 50.000 mortes humanas/ano consta nos documentos intitulados *World Survey of Rabies – WSR*, elaborados pela Organização Mundial da Saúde (WHO). Na edição do *WSR* nº 34, de 1998, a ocorrência mundial da raiva humana foi de 33.373 e 32.342 casos animais. Já na edição *WSR* nº 35, de 1999, os casos humanos baixaram para 1.866, enquanto em animais foram 34.141 casos. É notória a discrepância nos dados de um ano para outro e a partir deste número não foi mais editada a série de publicação intitulada *WSR* pela WHO. No final da década de 90 do século passado, tornou-se disponível a versão eletrônica RABNET para recuperar os dados de ocorrência da raiva no mundo, através do endereço <http://www.who.int/rabies/rabnet>.

Importância econômica e social

Os prejuízos econômicos diretos causados pelas mortes de animais alcançam milhões de dólares/ano em países do continente americano em que a economia

se baseia na produção de animais de interesse em saúde animal. Fora do Continente Americano, em locais em que não existem morcegos hematófagos, a ocorrência da raiva em animais domésticos é esporádica. Na América Latina, em 1984, o prejuízo econômico em consequência da raiva transmitida por morcegos hematófagos foi estimado em US\$ 42 milhões/ano, sendo que no Brasil esse valor se aproximava de US\$ 30 milhões (ACHA; MÁLAGA-ALBA, 1988).

Importância em saúde pública

Desde os tempos remotos, a raiva vem exigindo atenção dos governantes para o seu controle e, a partir do desenvolvimento de uma vacina antirrábica por Pasteur, há mais de cem anos, o perfil de ocorrência da raiva vem se alterando gradualmente nos países em que foram adotadas medidas de controle mais estritas voltadas para os reservatórios domésticos. A raiva humana determinada pela agressão por cães está decrescendo nas Américas, porém está se tornando cada vez mais frequente a participação de animais silvestres na transmissão da doença aos humanos (BELOTTO, 2000). No Estado do Pará, Brasil, foram registrados 22 óbitos humanos em 2004, e 24 mortes no Maranhão em 2005, com a maioria dos casos relacionada à transmissão pelos morcegos *D. rotundus* (BRASIL, 2011).

No mundo, os cães ainda representam 90% dos casos de exposição à raiva e aproximadamente 99% das mortes humanas pela raiva. Em muitos países em desenvolvimento, os custos desses programas impedem a sua execução. Em países desenvolvidos, o controle efetivo da raiva em cães representa um gasto adicional de recursos públicos. Nos EUA, esse custo foi estimado em mais de US\$300 milhões anuais, sendo a maioria destinada para a vacinação de cães. No Brasil, o orçamento destinado para a prevenção da raiva alcançou US\$ 28 milhões, em 2004. A cada ano, devem ser revacinados milhões de animais, e a reintrodução da doença através de transporte de animais infectados procedentes de outras áreas poderia representar possíveis falhas no programa (WHO, 2005).

Etiologia

O vírus da raiva

Até pouco mais da metade do século passado, acreditava-se na etiologia única do vírus da raiva acometendo um grande número de mamíferos. Os vírus apresentam forma cilíndrica semelhante a uma bala de revólver, com uma extremidade arredondada e outra mais plana, com diâmetro médio de 75 nm e comprimento de 100 a 300 nm, variando de acordo com a amostra considerada (TORDO, 1996).

O vírus da raiva é envelopado e sensível aos solventes orgânicos, como solução de sabão, éter, clorofórmio, acetona, etanol, solução de iodo e compostos de amônio quaternário, assim como formol, fenol, bicloreto de mercúrio, sais minerais, ácidos e álcalis fortes, detergentes, agentes físicos (calor, luz ultravioleta) e às condições ambientais, como dessecação, luminosidade e temperatura excessiva (WUNNER, 1991; KAPLAN, 1996).

Porém, o vírus permanece viável quando mantido em solução salina contendo 50% de glicerina (AGUILAR-SETIÉN et al., 2003), no estado liofilizado a 4°C, em fragmentos de tecido nervoso mantidos entre -30 e -60°C, ou em suspensões acrescidas de soro, leite ou gema de ovo esterilizado, que prolongam a viabilidade do vírus (MAYR; GUERREIRO, 1972).

O genoma dos lissavírus é composto por uma cadeia de RNA de fita simples não segmentado e não infeccioso, com polaridade negativa, com tamanho variando de 11 a 15 kb e peso molecular de 3,5 a 4,6 x 10⁶ KDaltons. O RNA genômico é transcrito em cinco RNAs mensageiros subgenômicos, que são traduzidos em cinco proteínas, mantendo a seguinte sequência: a nucleoproteína N, a fosfoproteína P (previamente denominada M₁), a proteína da matriz M (previamente denominada M₂), a glicoproteína G e a RNA polimerase-dependente (L). O gene apresenta duas regiões intergênicas não codificantes: uma está situada entre os genes que codificam M e G e a outra, entre os genes que codificam G e L, a qual foi previamente chamada “pseudogene – “ψ” (BROOKES et al., 2004).

Os primeiros estudos filogenéticos do vírus do gênero *Lyssavirus* foram realizados com sequência completa da nucleoproteína N. Posteriormente, surgiram outros estudos utilizando sequência parcial ou completa da nucleoproteína N, segmentos do gene G e região intergênica G-L, e sequência completa do gene P. Com o uso de técnicas da bioinformática, é possível comparar geneticamente uma amostra viral recém-isolada com outra registrada no GenBank, após o sequenciamento genômico, estudo do alinhamento (THOMPSON et al., 1997) e confecção do dendrograma, para permitir a análise filogenética e estudo de epidemiologia molecular (PAGE, 1996). As sequências do nucleotídeo estão depositadas no EMBL/GenBank78 (PATHINFO, 2006), identificados com números para acesso, por exemplo, D10499; K02869; AB117969; M61047.

Taxonomia

A Comissão Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV, 2009) inclui os vírus da raiva dentro do gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*,

representados por onze espécies: *Aravan virus* (ARAV), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Duvenhage virus* (DUVV), *European bat lyssavirus 1* (EBLV-1), *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2), *Irkut virus* (IKV), *Khujand virus* (KHUV), *Lagos batvirus* (LBV), *Mokola virus* (MOKV), *Rabies virus* (RABV) e o *West Caucasian bat virus* (WCBV).

Os vírus do gênero *Lyssavirus* eram diferenciados em quatro sorotipos distintos, a saber: sorotipo 1 ou os vírus “clássicos” da raiva; o sorotipo 2 ou o Lagos bat vírus; sorotipo 3 ou Mokola vírus, isolado do musarinho *Crocidura sp.*, em 1968 na Nigéria, e o sorotipo 4, Duvenhage vírus, isolado de um paciente humano que havia sido mordido por um morcego insetívoro não identificado na África do Sul, em 1970. Os sorotipos de 2 a 4 foram denominados de vírus relacionados à raiva (rabies-related ou rabies-like) (SHOPE et al., 1970). Outros vírus isolados de morcegos insetívoros da Europa haviam sido designados pelo nome do seu gênero, o *European bat Lyssavirus* tipo 1, isolado do morcego insetívoro *Epitesicus serotinus* da Dinamarca em 1985, e o *European bat Lyssavirus* tipo 2 (EBLV-2), isolado de um biólogo suíço morto após manifestar doença semelhante à raiva, na Finlândia, em 1985, e mais tarde isolados de morcegos insetívoros *Myotis daubentoni* e *Myotis dasicneme*, da Europa (FOOKS, 2004).

A partir de 1994, os sorotipos passaram a ser denominados de genótipos e os sorotipos 1 a 4, constituídos pelos RABV, LBV, MOKV e DUVV, passaram a ser designados como genótipos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os EBLV-1 e EBLV-2 isolados da Europa foram designados como genótipos 5 e 6 (WHO, 1994), e os vírus isolados de morcegos frugívoros e insetívoros da Austrália, como genótipo 7 (GOULD et al., 1998).

Outros quatro lissavírus foram incluídos no gênero *Lyssavirus*: Aravan vírus (ARAV) como genótipo 8, isolado do morcego insetívoro *Myotis blythi*, no Quirguistão, Ásia Central (ARAI et al., 2003); Khujand vírus (KHUV), genótipo 9, isolado do morcego insetívoro *Myotis mystacinus*, no Norte de Tajiquistão (KUZMIN et al., 2003); e Irkut vírus (IRKV), genótipo 10, isolado do morcego *Murina leucogaster*, na Sibéria Oriental. O lissavírus isolado do morcego *Miniopterus schreibersi* da montanha do Cáucaso passou a ser denominado de genótipo 11, “West Caucasian Bat lyssavirus (WCBV)” (BOTVINKIN et al., 2003). Mais recentemente, o Shimoni vírus (SHIBV) isolado do morcego *Hipposideros commersoni* no Quênia, foi descrito como nova espécie do gênero *Lyssavirus* (KUZMIN et al., 2010).

Os lissavírus foram categorizados em dois ou três filogrupos distintos. Os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7, o Aravan vírus, Khujand vírus e o Irkut vírus compõem o filogrupo I. O grupo II contém os dois vírus africanos divergentes,

os genótipos 2 e 3. O mais divergente WCBV foi colocado à parte, no filogruppo III. Os lyssavírus LBV, MOKV e DUVV estão restritos geograficamente à África, os EBLVs, aos morcegos insetívoros da Europa e o ABLV, aos morcegos frugívoros e insetívoros da Austrália (FOOKS et al., 2003).

Apesar do número cada vez mais crescente de espécies no gênero *Lyssavirus*, a *World Organisation for Animal Health* (OIE) considera como sendo raiva apenas a doença causada pelos vírus do genótipo 1 (OIE, 2011). Os vírus relacionados à raiva (genótipos 2 a 4) foram denominados de “lissavírus não raiva”, incluindo outros genótipos (5 a 11) que são conhecidos genericamente por lissavírus. A doença neurológica observada no homem e nos animais é denominada de lissaviose (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2009).

Os lissavírus (EBL1 e EBL2) isolados de morcegos insetívoros da Europa são mesmo vírus da raiva? Embora Shope et al. (1970) tenham introduzido o termo “vírus relacionados à raiva”, pois a doença causada pelo LBV era indistinguível da raiva clássica (genótipo 1), esse termo deve ser abandonado e os lissavírus devem ser tratados como agentes causadores da raiva (KING, HAAGSMA; KAPPELER, 2004).

Hospedeiros

No mundo, os hospedeiros considerados “reservatórios” variam conforme a localização geográfica. Na América do Norte, com o desaparecimento do vírus na população de cães e gatos domésticos, os reservatórios silvestres do vírus da raiva são raposas (*Vulpes vulpes*), raccoons (*Procyon lotor*), cangambá (*Mephitis mephitis*), lobos (*Canis lupus*), coiotes (*Canis latrans*), raposas do ártico (*Alopex lagopus*) e diferentes espécies de morcegos insetívoros. No México, além de coiotes e gambás, o vírus é encontrado na população de morcegos hematófagos e não hematófagos.

Na Europa, as raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) e o raccoon-dog (*Nictereutes procyonoides*) são os mais citados. No Continente Africano, além de cães, os carnívoros silvestres, tais como hienas (*Hyaena brunnea*, *Crocuta crocuta*), chacais (*Canis simensis*, *Canis mesomelas*, *Canis adustus*), mangusto amarelo (*Cynictis penicillata*), raposas (*Otocyon megalotis*, *Vulpes* sp) e civetas (*Civettictis civetta*), são os mais importantes (MACINNES, 1988; RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001).

Nas ilhas do Caribe Espanhol, o vírus é isolado do mangusto comum (*Herpestes auropunctatus*). Na América do Sul, há relatos de isolamento de guaxinim (*Procyon cancrivorus*), lobo-guará (*Crysocyon brachyurus*), sagui

do Nordeste (*Callithrix jacchus*), raposa do Nordeste (*Dusicyon vetulus*), coati (*Nasua nasua*), cachorro-domato (*Cerdocyon thous*), gato-domato (*Leopardus tigrinus*), onça-pintada (*Panthera onca*), além de numerosas espécies de morcegos (CORRÊA; PASSOS, 2001).

Dentre as espécies consideradas como hospedeiros terminais, os bovinos (*Bos taurus*, *Bos indicus*), equinos (*Equus caballus*), caprinos (*Capra hircus*), ovinos (*Ovis aries*), búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) e silvestres, suínos (*Sus domesticus*), javalis (*Sus scrofa*), iaques (*Bos grunniens*), diferentes espécies de cervos, lhamas (*Lama guanicoe*), elefantes, dentre outros, são as espécies não carnívoras mais envolvidas com os episódios da raiva. Por sua vez, a raiva envolvendo roedores como coelhos (*Lepus* sp), cobaias (*Cavea porcellus*), hamsters (*Mesocricetus auratus*) e esquilos (*Callosciurus* sp) é rara na literatura (SODJA; MATOUCH; LIM, 1971; BROWN; TINGPALAPONG; ANDREWS, 1979; SVRCEK; ONDREJKA; MLYNARCIKOVA, 1984; WINKLER, 1991; MATTOS; MATTOS; RUPPRECHT, 2001), muito provavelmente porque esses animais não resistiriam ao ataque de um animal raivoso como cães, gatos ou outros reservatórios carnívoros (CHILDS et al., 1997).

Referências

1. ACHA, P.N.; MÁLAGA-ALBA, A. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: GREENHALL, A.M.; SCHMIDT, U. *Natural history of vampire bats*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.207-214.
2. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3. ed. Washington: Organización Panamericana De La Salud, 2003. v.2, p. 425.
3. ADAMSON, P.B. The spread of rabies into Europe and the probable origin of this disease in antiquity. *Journal of the Royal Asiatic Society of Great Britain & Ireland*, Cambridge, v.2, p.140-4, 1977.
4. AGUILAR-SETIÉN, A.; AGUILA-TECUATL, H.; TESORO-CRUZ, E.; RAMOS-RAMIREZ, L.; KRETSCHMER, R.S. Preservation of rabies virus RNA from brain tissue using glycerine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v.97, n.5, p.547-549, 2003.
5. ARAI, Y.T.; KUZMIN, I.V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A.D. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythii*), Kyrgyzstan. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.9, n.3, p.333-337, 2003.
6. BAER, G.M. *The Natural History of Rabies*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 620.
7. BAER, G.M.; SMITH, J.S. Rabies in non-hematophagous bats. In: BAER, G.M. *The Natural History of Rabies*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 341-366.
8. BATISTA-MORAIS, N.; NEILSON-ROLIM, B.; MATTOS-CHAVES, H.H.; DE BRITONETO, J.; MARIA-DA-SILVA, L. Rabies in tamarins (*Callithrix jacchus*) in the state of Ceará, Brazil, a distinct viral variant? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.5, p.609-610, 2000.
9. BELL, J.F.; GONZALEZ, M.A.; DIAZ, A.M.; MOORE, G.J. Nonfatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.32, n.12, p.2049-2058, 1971.

10. BELOTTO, A.J. Situação da raiva no mundo e perspectivas de eliminação da raiva transmitida pelo cão na América Latina. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2000, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2000. p. 20-21.
11. BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S.A.; WANDELER, A.I.; ARMASTRONG, J.; GOMES, A.A.; LIMA, F.S.; NOGUEIRA, F.R.; ITO, F.H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals identifies the hoary fox as rabies reservoir. *Journal of General Virology*, London, v.86, n.11, p.3153-3162, 2005.
12. BLANCOU, J. Rabies in Europe and the Mediterranean Basin: From antiquity to the 19th century. In: KING, A.A.; FOOKS, A.R.; AUBERT, M.; WANDELER, A.I. *Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. Paris: World Organization for Animal Health (OIE), 2004.p.15-24.
13. BOTVINKIN, A.D.; POLESCHUK, E.M.; KUZMIN, I.V.; BORISOVA, T.I.; GAZARYAN, S.V.; YAGER, P.; RUPPRECHT, C.E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.9, n.12, p.1623-1625, 2003.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos confirmados de Raiva Humana segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011***. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_confirmados_raiva_humana_90_11.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2011.
15. BROOKES, S.M.; MCELHINNEY, L.M.; JOHNSON, N.; BADRANE, H.; TORDO, N.; FOOKS, A.R. Rabies virus variants and molecular epidemiology in Europe. In: KING, A.A.; FOOKS, A.R.; AUBERT, M.; WANDELER, A.I. *Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. Paris: World Organization for Animal Health (OIE), 2004. p.243-258.
16. BROWN, J.L.; TINGPALAPONG, M.; ANDREWS, W.K. Serological survey of feral rodents in Thailand for evidence of rabies virus infection. *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, v.15, n.4, p.601-606, 1979.
17. CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. *Annales de L'Institut Pasteur*, Paris, v.25, p.843-846, 1911.
18. CARNEIRO, V. As epizootias de raiva na América e o papel dos morcegos hematófagos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.7, p. 273-321, 1936.
19. CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J.; FAHL, W.O.; VÉRAS, N.M.; CARRIELI, M.L.; KOTAIT, I. Molecular characterization of rabies virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. *Virus Research*, Amsterdam, v.141, n.1, p.81-89, 2009.
20. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vaccines and preventable diseases: rabies vaccination. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/rabies/default.htm>>. Acesso em: 02 maio 2010.
21. CHILDS, J.E.; COLBY, L.; KREBS, J.W.; STRINE, T.; FELLER, M.; NOAH, D.; DRENZEK, C.; SMITH, J.S.; RUPPRECHT, C.E. Surveillance and spatiotemporal associations of rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1985-1994. *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, v.33, n.1, p.20-27, 1997.
22. CORRÊA, S.H.R.; PASSOS, E.C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M.E. *Biology, medicine and surgery of South American wild animals*. Ames: Iowa State University Press, 2001. p.493-499.
23. FERREIRA, L.A.P. **O conceito de contágio de Girolamo Fracastoro nas teses sobre sífilis e tuberculose**, 2008. 159 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Curso de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
24. FIELD, H.; YOUNG, P.; YOB, J.M.; MILLS, J.; HALL, L.; MACKENZIE, J. The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes and Infection*, Paris, v.3, n.4, p.307-314, 2001.
25. FRASER, G.C.; HOOPER, P.T.; LUNT, R.A.; GOULD, A.R.; GLEESON, A.D.; RUSSEL, G.M.; KATTENBELT, J.A. Encephalitis caused by a *Lyssavirus* in fruit bats in Australia. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.2, n.4, p.327-331, 1996.
26. FOOKS, A. The challenge of new and emerging lyssaviruses. *Expert Review of Vaccines*, London, v.3, n.4, p.333-336, 2004.
27. FOOKS, A.R.; BROOKES, S.M.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L.M.; HUTSON, A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v.131, n.3, p.1029-1039, 2003.
28. GOULD, A.R.; HYATT, A.D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J.A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Research*, Amsterdam, v.54, n.2, p.165-87, 1998.
29. HAUPT, H.; REHAAG, H. Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina, transmitida por morcegos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, Nova Iguaçu, v.2, p.17-47, 1925.
30. ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy: 2009 Release. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>>. Acesso em: 12 jul. 2010.
31. KAPLAN, M.M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996.p.3-8.
32. KING, A.A.; HAAGSMA, J.; KAPPELER, A. Lyssavirus infections in European bats. In: KING, A. A.; FOOKS, A. R.; AUBERT, M.; WANDELER A. I. *Historical Perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. Paris: World Organization for Animal Health (OIE), 2004.p.221-241.
33. KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, Y.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T.; GOJOBORI, T. Evolutionary history of dog rabies in Brazil. *The Journal of General Virology*, London, v.92, n.1, p.85-90, 2011.
34. KUZMIN, I.V.; MAYER, A.E.; NIEZGODA, M.; MARKOTTER, W.; AGWANDA, B.; BREIMAN, R.F.; RUPPRECHT, C.E. Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Research*, Amsterdam, v.149, n.2, p.197-210, 2010.
35. KUZMIN, I.V.; ORCIARI, L.A.; ARAI, Y.T.; SMITH, J.S.; HANLON, C.A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C.E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Research*, Amsterdam, v.97, n.2, p.65-79, 2003.
36. MACHADO, C.G. Reflexões sobre a raiva humana. *Boletim do Instituto Pasteur*, São Paulo, v.1, n.1, p.3-6, 1996.
37. MACINNES, C.D. Control of wildlife rabies: The Americas. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.381-405.
38. MATTOS, C. A. de; MATTOS, C. C. de; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields' Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1245-1274.
39. MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. Vírus da raiva. In:_____. *Virologia Veterinária*. Porto Alegre: Sulina, 1972. p.437.
40. MUTINELLI, F.; STANKOV, S.; HRISTOVSKI, M.; SEIMENIS, A.; THEOHARAKOU, H.; VODOPIJA, I. Rabies in Italy, Yugoslavia, Croatia, Bosnia, Slovenia, Macedonia, Albânia & Greece. In: KING, A.A.; FOOKS, A.R.; AUBERT, M.; WANDELER, A.I. *Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. Paris: World Organization for Animal Health (OIE), 2004.p.93-118.
41. NADIN-DAVIS, S.A.; BINGHAM, J. Europe as a source of rabies for the rest of the world. In: KING, A.A.; FOOKS, A.R.; AUBERT, M.; WANDELER A.I. *Historical Perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. Paris: World Organization for Animal Health (OIE), 2004.p.259-280.
42. NILSSON, M.R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*, Washington, v.68, n.6, p.486-94, 1970.
43. OIE. World Organisation for Animal Health. Rabies. In:_____. *Manual of Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*(NB: Version adopted in May 2011) 2011. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf> Acesso em: 08 ago. 2011.
44. PAGE, R.D. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, Oxford, v.12, n.4, p.357-358, 1996.

45. PATHINFO (PathogenInformation). Rabies. [2006]. Disponível em: <http://ci.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Rabies_virus_Info.shtml>. Acesso em: 15 abr. 2010.
46. PAWAN, J.L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.30, n.4, p.101-130, 1936.
47. RUPPRECHT, C.E.; STÖHR, K.; MEREDITH, C. Rabies. In: WILLIAMS, E.S.; BARKER, I.K. **Infectious Disease of Wild Mammals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. p.3-36.
48. SHOPE, R.E.; MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; CAUSEY, O.R.; KEMP, G.E.; SIMPSON, D.I.; MOORE, D.L. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v.6, n.5, p.690-692, 1970.
49. SODJA, I.; MATOUCH, O.; LIM, D. Isolation of rabies-like virus from murine rodents. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, Prague, v.15, n.2, p.229-230, 1971.
50. SODRÉ, M.M.; GAMA, A.R.; ALMEIDA, M.F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo**, v.52, n.2, p.75-81, 2010.
51. SVRCEK, S.; ONDREJKA, R.; MLYNARCIKOVA, K.; SVEC, J. Rabies in common hamster (*Cricetus cricetus*) in Slovakia. **Veterinární Medicína**, Praha v.29, n.11, p.643-652, 1984.
52. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. **Rabies: Hydrophobia, Lyssa** (Oct. 2009). Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2010.
53. THOMPSON, J.D.; GIBSON, K.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v.25, n.24, p. 4876-4882, 1997.
54. TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p.28-51
55. UIEDA, W.; HAYASHI, M.M.; GOMES, L.H.; SILVA, M.M.S. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, São Paulo, v.1, n.2, p.17-35, 1996.
56. UOL. Economia. Últimas notícias. **Morcegos transmitiram raiva a gado na fronteira Uruguai-Brasil. 2007**. Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/ultnot/afp/2007/10/31/ult35u56101.jhtm>>. Acesso em: 03 maio 2011.
57. VAN DER MERWE, M. Bats as vectors of rabies. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v.78, p.421-422, 1982.
58. VENTERS, H.D.; HOFFERT, W.R.; SCHATTERDAY, J.E.; HARDY, A.V. Rabies in bats in Florida. **American Journal of Public Health**, Albany, v.44, n.2, p.182-185, 1954.
59. WILKINSON, L. History. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W. **Rabies**. San Diego: Academic Press; 2002. p.1-21.
60. WINKLER, W.G. Rodent rabies. In: BAER, G.M. **The natural history of rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.405-410.
61. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Communicable diseases prevention and control: new, emerging and re-emerging infectious diseases. In: WORLD HEALTH ASSEMBLY, 48, 1995, Geneva. Switzerland: World Health Organization, 1995. (DocumentWHA48.13).
62. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies: A neglected zoonotic disease. [2010]. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/en/>>. Acesso em: 13 jul. 2010.
63. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Technical Report Series 931 – First Report. In: WHO Expert Consultation on Rabies. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2005. 88 p.
64. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Workshop on Genetic and Antigenic Molecular Epidemiology of Lyssaviruses. Niagara Falls, Canada: World Health Organization, 1994. p.7.
65. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Survey of Rabies, Nº 34, 1998. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/resources/en/wsr98_table1.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2010
66. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Survey of Rabies, Nº 35, 1999. Geneva. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/resources/wsr1999/en/>>. Acesso em: 15 jun. 2010.
67. WUNNER, W.H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G.M. **The Natural History of Rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.31-67.
68. YAKOBSON, B.A.; DAVID, D.; ALDOMY, F. Rabies in Israel and Jordan. In: KING, A.A.; FOOKS, A.R.; AUBERT, M.; WANDELER A.I. **Historical Perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin**. Paris: World Organization for Animal Health (OIE), 2004. p.171-183.





II ENDESA

II ENDESA - Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal

3 a 7 de outubro de 2011

Memorial da América Latina, São Paulo (SP)

Realização: Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Soroprevalência da CAE em caprinos leiteiros do território do Sisal, Bahia

Seroprevalence of CAE in dairy goats in the Sisal region, state of Bahia, Brazil

Veschi, J.L.a.¹; Martins, R.J.²; Zafalon, L.F.³; Costa, M.M.⁴; Ramos, E.M.⁵; Peixoto, R.M.⁶; Castro, R.S.⁷

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma das mais importantes enfermidades infecciosas dos caprinos. Essa síndrome multissistêmica de ocorrência mundial e caráter crônico é causada por um Lentivirus dos Pequenos Ruminantes (LVPR) e caracteriza-se por poliartrite, mastite e pneumonia nos adultos e leucoencefalomielite nos jovens. No Brasil, a CAE tem sido relatada em várias regiões. Foram avaliados 1.120 animais de ambos os sexos e de diferentes faixas etárias de 52 rebanhos de caprinos leiteiros de três municípios e dois distritos do Território do Sisal, no Estado da Bahia, por imunodifusão em gel de ágar para avaliar a soroprevalência de anticorpos do vírus da CAE. Em cada rebanho, foram coletadas pelo menos 15 amostras de sangue, estratificadas da seguinte maneira: um reprodutor, sete a nove matrizes em lactação, quatro a sete cabritas púberes e três a cinco filhotes em aleitamento. A variação do número de animais amostrados foi devido à disponibilidade de animais em cada propriedade. A soroprevalência geral foi de 12,05% (135/1.120). A maior soroprevalência foi encontrada no município de Santa Luz, com 21,43%, e a menor no distrito de Ouro Verde, em que somente 4,66% dos animais avaliados apresentaram resultado positivo ao teste de IDGA. Todos os distritos que tiveram animais avaliados no presente estudo apresentaram positividade para CAE. A soropositividade dos rebanhos foi de 30,77% (16/52), com mínima de 20,0% (São Domingos) e máxima de 50% (Santa Luz). Diante dos resultados obtidos, é possível concluir-se que a CAE está amplamente disseminada nos animais leiteiros dos municípios estudados do Território do Sisal, Estado da Bahia. Considerando a importância da caprinocultura leiteira para os criadores dessa região, é necessária a intensificação das medidas sanitárias necessárias para o controle da CAE.

*Bolsista PIBIC CNPq/Embrapa.
Embrapa, CNPq e Mapa.

¹EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido, CP 23, CEP 56302-970, Petrolina, PE, Brasil
E-mail: josi.veschi@cpatsa.embrapa.br

²Universidade de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas Recife, PE, Brasil.

³Embrapa, Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

⁴Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil. ⁵Médico veterinário autônomo, Petrolina, PE, Brasil.

⁶Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Floresta, PE, Brasil.

⁷Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, Pernambuco, Brasil

Development of a microplate immunocapture rt-pcr assay for the detection of avian influenza virus

Desenvolvimento de um método de captura RT-PCR em microplacas para a detecção do vírus da influenza aviária

Montassier, H. J.¹; Di Pillo, F.²; Brentano, L.³; Montassier, M.F.S.¹; Reischak, D.⁴; Mendonça, A.⁴

Avian influenza viruses (AIV) cause infection processes in several species of birds and is particularly important in chickens, varying from unapparent to severe disease and death, depending on the host and virus strain. AIV infections can be diagnosed by analyzing tracheal or cloacal swab samples collected from infected birds, but when highly pathogenic AIV is suspected to be involved in an outbreak, in addition to oral and cloacal swabs, other tissues should be often targeted to monitor this infection in birds. The polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-PCR (RT-PCR), including the conventional and real-time RT-PCR techniques have been routinely used for the rapid detection of Matrix glycoprotein gene (M gene) of AIV and for the laboratory diagnosis of this virus infection. Despite the availability of various RNA extraction methods for using in RT-PCR, isolation and detection of viral RNA are still difficult due to the unstable nature of viral RNA molecules and the presence of PCR inhibitory substances in biological samples. In this study, a simple method using polyclonal antibodies from AIV hyperimmunized chicken sera were used for developing a microplate immune-capture (MIC) method to recover viral RNA from samples containing the H₂N₂ AIV strain and the results were compared to a standard commercial method recommended for AIV RNA extraction; the Ambion H MagMAXMkit; followed by the application of conventional and real-time RT-PCR methods. The results showed that both RNA extraction methods were equally efficient in detecting the H₂N₂ AIV in conventional and real-time IC-RT-PCR, without generating non-specific detection of non-related avian RNA-virus pathogens, such as Newcastle disease virus, avian infectious bronchitis virus and Gumboro Disease Virus. Comparable analytical sensitivity was also found in RT-PCR techniques by testing RNA obtained from MIC or standard RNA extraction, either when AIV was tested in allantoic fluid suspensions or in spiked tracheal and cloacal swab samples. In conclusion, the MIC protocol reported in the present study can be advantageously used in extracting high-quality RNA for accurate detection of AIV from tracheal and cloacal swabs, or allantoic fluid samples by conventional and real-time RT-PCR techniques and could be an alternative to the imported commercial RNA extraction kits.

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Departamento de Patologia Veterinária, Laboratório de Virologia e Imunologia, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n°, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.
E-mail: heliojm@fcav.unesp.br

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, SP, Brasil.

³Embrapa, CNPSA, Concórdia, SC, Brasil.

⁴Lanagro, Campinas, SP, Brasil.

Polymorphism of rabies virus nucleoprotein from samples isolated in the Rio de Janeiro state, Brazil*

Polimorfismo da nucleoproteína do vírus da raiva de amostras isoladas no Estado do Rio de Janeiro

Pereira, S.R.F.G.¹; Chicarino, C.N.¹; Vieira, L.F.P.¹; Castilho, J.G.²; Meireles, M.A.D.¹; Kotait, I.²; Câmara, F.P.³

Rabies virus belongs to genus *Lyssavirus* of the family *Rhabdoviridae*. The viral nucleoprotein is responsible for several functions in viral particle such as, packing and protects the RNA genome, and participates of transcription and replication of genome. Rabies cause large loss in livestock industry from Rio de Janeiro State, Brazil. All regions of the State are affected by rabies virus transmitted by vampire bat. This work aims to evaluate the changes between the sequences of the nucleoprotein of rabies virus isolated in Rio de Janeiro State. The nucleoprotein gene of 32 samples was sequenced. The sequences length were 1,301 nucleotide, that encoding 433 amino acids. These sequences were aligned with reference sequence Pasteur virus fixed strain (PV GenBank accession number M13215), using ClustalW method. The nucleotide and amino acid polymorphism were analyzed manually using the BioEdit software. Among the samples of herbivores were showed 95 (7,30%) positions with mutation of nucleotides. When comparing the 32 samples of herbivores with PV (GenBank M13215), we observed that there were 257 (19,75%) positions with mutation. Replacements of the transition type were more frequent than the transversion type. Mutations in third nucleotide of the codon were more frequent than in first and second nucleotide. Among the sequences of amino acid from herbivores were showed 13 positions of amino acid substitution. It was observed an increase of 21 replacement of amino acid when the herbivores sequences were compared with PV, totalizing 34 amino acid mutations. The samples of rabies virus show high polymorphism of its nucleotides, but at the level of amino acid the polymorphism is low and even when there are changes in many cases amino acid replacement occurs by the same biochemical amino acid group. Thus the mutations found among the samples have little difference in functionality of the protein, but the nucleotide mutations can be used in rabies epidemiological studies.

*CNPq/Mapa/SDA Auxílio Financeiro Edital N° 064/2008. CNPq Bolsa.

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia e Vírus, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

E-mail: silvia.goncalves@pq.cnpq.br

²Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Microbiologia Professor "Paulo de Góes", Setor de Epidemiologia de Doenças Infecciosas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Shelters of vampire bats: identifying and mapping in rural areas of Rio de Janeiro and Espírito Santo states, Brazil*

Abrigos de morcegos hematófagos: identificação e mapeamento em áreas rurais dos Estados de São Paulo e Espírito Santo

Bernardo-Pedro, T.¹; Pereira, S.R.F.G.¹; Chicarino, C.N.¹; Vieira, L.F.P.¹; Azevedo, F.A.M.²; Meireles, M.A.D.¹; Câmara, F.P.³

In Brazil, there are 150 species of bats, all of them from suborder *Microchiroptera*. Three of them correspond to vampire bats: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* and *Diaemus youngi*. The common vampire bat *D. rotundus* has been the main reservoir of rabies virus in rural areas. Shelters of bats can be classified as natural or artificial. The study was conducted between 2008 and 2011. Twenty-one shelters were mapped with a GPS unit. *D. rotundus* were captured in nine field trips, using mesh nets set up in front of shelters. Ten shelters were mapped in Campos dos Goytacazes; six were artificial and four were natural; they were located at S22°00'26,4"-W041°40'00,3"/S21032'14,7"-W041020'31,3"/S21048'31,2"-W041038'20,7"/S21048'29,4"-W041038'22,0"/S22000'40,6"-W041039'98,0"/S21057'53,2"-W041027'59,0"/S21058'18,3"-W041027'03,2"/S21047'09,6"-W041014'00,8"/S21046'02,6"-W041035'44,0"/S21047'54,2"-W041036'28,2". Six shelters were found in Cardoso Moreira; half of them were artificial, and the other half were natural; they were located at S21032'07,5"-W041035'46,9"/S21032'29,0"-W041036'31,8"/S21027'29,4"-W041034'36,2"/S21026'43,7"-W041033'43,1"/S21030'28,7"-W041027'20,5"/S21032'29,9"-W041036'31,8". Two shelters were mapped in Miracema; one was natural, and the other was artificial; their location was S21°23'39,3"-W042°04'32,4"/S21019'29,1"-W042007'49,1". One shelter was found in Quissamã; it was artificial and located at S22°05'15,7"-W041°41'20,2". Another shelter was found in Bom Jesus do Norte; it was artificial and located at S21°06'45,8"-W041°40'55,6". The last shelter was mapped in Italva; it was natural and located at S21°27'06,4"-W041°43'34,2". In a field trip to Campos dos Goytacazes (S22°00'26,4"-W041°40'00,3"), four male bats were captured. In Miracema (S21°23'39,3"-W042°04'32,4"), 28 males and 23 females were captured in three field trips. In Quissamã, 117 bats (59 males and 58 females) were captured in three field trips too. In a field trip to Bom Jesus do Norte, 26 males and 46 females were captured. In the last field trip, to Italva, one male and 13 females were captured. All mapped shelters were located in rural areas (distant from urban centers), and most of them were far from human habitations. Most shelters were artificial, showing the direct influence of humans on the spread of bats. All field trips were made during the day, except the one to Bom Jesus do Norte, made at night. In Italva, one vampire bat *D. ecaudata* was found. A total of 263 bats were captured. Vampire bats play an important role in rabies transmission, then the identification and mapping of their shelters are essential to control the rural cycle of the disease.

*CNPq/Mapa/SDA Auxílio Financeiro Edital N° 064/2008. CNPq Bolsas.

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia e Vírus Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: thiago.b.pedro@gmail.com

²Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Microbiologia Professor "Paulo de Góes", Setor de Epidemiologia de Doenças Infecciosas Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Diagnóstico molecular por PCR de ectima contagioso em caprinos e ovinos

Molecular diagnosis by PCR of contagious ecthyma in goat and sheep

Santana, R.L.¹; Gomes, A.L.V.¹; Junior, J.H.P.¹; Nascimento, S.A.¹; Gil, L.H.V.G.²; Bertani, G.R.³; Leite, A.S.⁴; Alencar, C.A.S.⁴; Maia, R.C.C.¹; Castro, R.S.

O ectima contagioso (EC) é uma virose aguda que acomete caprinos e ovinos, amplamente disseminada em todo o mundo. No Brasil, onde a ovinocaprinocultura é amplamente praticada para produção de pele, carne e leite, EC tem sido relatado como uma das principais enfermidades infecciosas de caprinos e ovinos. Em certas situações, EC pode ser clinicamente confundido com enfermidades vesiculares, como a febre aftosa, sendo assim necessário um teste laboratorial direto para definição do diagnóstico diferencial, preferencialmente de rápida execução, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que ainda não tem sido amplamente testada com amostras brasileiras do vírus EC. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar uma PCR para diagnóstico de EC. O DNA foi extraído de crostas de animais clinicamente afetados por EC e de sobrenadantes de células de córnea fetal caprina (FCC 40) após passagem dessas amostras. A PCR foi realizada empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores PPP3 (5'-tac gtg gga agc gcc tcg ct-3') e PPP4 (5'-gcg agt ccg aga aga ata cg-3') que amplificam um produto de 235 pb do gene B2L, da cepa NZ2 do vírus EC. As condições de ciclagem consistiram em incubação inicial a 94° C por três minutos, seguida de 30 ciclos: desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 65° C por 30 segundos, extensão a 72° C por um minuto, 72° C por dez minutos e uma etapa final a 4° C. Foram processadas oito amostras de caprinos e 25 de ovinos, originários dos Estados da Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia. De todas as amostras, foi amplificado um fragmento do tamanho esperado. Para confirmação do diagnóstico, doze produtos de amplificação da PCR foram sequenciados. A análise das seqüências através do método de *neighbor-joining*, usando os parâmetros do modelo Tamura 3 de substituição de nucleotídeos com mil replicatas, mostrou que entre o grupo de seqüências analisadas há 99% de similaridade e 67%, quando comparado com outras amostras brasileiras e asiáticas. A significativa divergência com outras amostras indica que é necessária a avaliação de um maior número de amostras de diferentes regiões do País para validar a PCR como teste de diagnóstico. Espera-se que a PCR definitivamente validada possa ser usada para diferenciação de EC da febre aftosa, sobretudo como suporte às ações do Programa Nacional de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa, no qual os caprinos e ovinos são considerados animais sentinelas.

CNPq, Mapa e Fapece.

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Medicina Veterinária, Dom Manuel Medeiros, s/nº
CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.
E-mail: scastro@dmv.ufrpe.br

²Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

³Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Lanagro
Recife, PE, Brasil.

Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (ihhmv) and infectious myonecrosis virus (imnv) in *litopenaeus vannamei* in northeast Brazil*

Coinfecção natural com o vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (VNHVI) e o vírus da mionecrose infecciosa (VMI) em Litopenaeus vannamei no Nordeste do Brasil

Vieira, P.R.N.¹; Teixeira, M.A.¹; Cruz, J.E.F.¹; Branco, I.R.C.²; Costa, F.H.F.³; Rádís-Baptista, G.¹

Cultivation of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) constitutes a growing aquaculture industry in Northeast Brazil. Similar to other animals that are intensively farmed, shrimp experience disease outbreaks, which are a constant threat and cause eventually significant economical losses. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) are prevalent epizootic viral agents in Brazil. In a routine monitoring program for the diagnosis of IHHNV and IMNV, using molecular techniques like conventional PCR, reverse transcription coupled with PCR (RT-PCR) and absolute quantitative real time PCR (qPCR), we found that most positive samples of shrimp were simultaneously co-infected with both viruses. This survey is the first to show the occurrence of a natural co-infection that is caused by IHHNV and IMNV in penaeid shrimp attacked by viral disease that were cultivated in Northeast Brazil. Taken together, RT-PCR can be readily employed in the routine diagnostic screening program for shrimp viruses in the aquaculture industry. Moreover, in combination with qPCR, diagnosis of the viral load and co-infection can be absolutely assessed and the data used to assist differential management plans for epizootic control.

*Research supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (National Program for Animal Health; grant #578460/08-4).

‡All supported by fellowships for Technological and Industrial Development (DTI-3) from CNPq.

¹Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar
Av. da Abolição 3207, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil.
E-mail: gandhi.radis@ufc.br

²Associação dos Criadores Cearenses de Camarão, Fortaleza, CE, Brasil.

³Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca,
Fortaleza, CE, Brasil.

Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR*

Diagnóstico diferencial do vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética na forma ativa com base na escolha do gene e transcrição reversa por meio de PCR

Teixeira, M.A.¹; Cruz, J.E.F.¹; Vieira, P.R.N.¹; Branco, I.R.C.²; Costa, F.H.F.³; Rádís-Baptista, G.¹

The Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) is one of the most important cultivated species in world aquaculture. In Brazil, the Northeastern states are home to the main shrimp producers. As shrimp aquaculture has expanded and intensified, diseases have progressively become one of the most serious threats to this industry. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is an enzootic viral agent in Brazilian shrimp farms. These viruses are usually diagnosed by histological methods. However, to detect sub-clinical or acute IHHNV infection, more refined methods based on molecular techniques have been utilized. We found that by using “universal” primers and a single-step PCR diagnostic test, it was difficult to distinguish between non-infective forms of the virus and active IHHNV. Detection of IHHNV was more accurate when we used two alternative molecular strategies, namely 1) single-step PCR amplification based on gene choice and 2) reverse transcription coupled with PCR. This communication presents the results of

our strategy that can be adaptable for routine diagnostic programs in shrimp culture for detecting the presence of active IHNV virus.

*Research supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (National Program for Animal Health; grant #578460/08-4).

‡All supported by fellowships for Technological and Industrial Development (DTI-3) from CNPq.

¹Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar
Av. da Abolição 3207, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil.
E-mail: gandhi.radis@ufc.br

²Associação dos Criadores Cearenses de Camarão, Fortaleza, CE, Brasil.

³Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, CE, Brasil.

Cloning and expression of recombinant nucleoprotein (NP) and haemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein of Newcastle disease virus for using in the detection of specific antibodies by indirect ELISA

Clonagem e expressão da nucleoproteína (NP) e da glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) do vírus da doença de Newcastle (VDN) para aplicação na detecção de anticorpos específicos pelo método indireto de ELISA

Silva, K.R.; Gonçalves, M.C.M.; Montassier, M.F.S.; Fernandes, C.C.; Oliveira, E.S.; Montassier, H.J.

Newcastle disease (ND) is one of the most important disease for the poultry industry worldwide. Newcastle disease virus (NDV) is the causative agent and usually induces severe lesions in respiratory and digestive tracts, requiring increasingly rapid and effective techniques for the laboratory diagnosis. NDV virions are made of three envelope and three core structural proteins, from which the major antigens were identified; as the haemagglutinin-Neuraminidase (HN) envelope glycoprotein and nucleocapsid (NP) protein. The HN glycoprotein is involved in virus attachment to the host cell receptors and contains relevant virus-neutralizing and haemagglutinating-inhibitor epitopes. The nucleocapsid protein (NP) of NDV has highly conserved amino acid sequences, and a high immunogenicity. Several methods have been investigated for the laboratory diagnosis of NDV infection, including serological tests, such as haemagglutination inhibition (HI) assays and conventional ELISA methods which depend on laborious and time-consuming procedures of virus propagation in SPF embryonated chicken eggs, and the purification of virus particles to be adsorbed to the microplate solid phase. This study aimed to clone the full open reading frame of NP gene, and the 5'-part and 3'-part of HN gene of NDV in a heterologous system (*Escherichia coli*), using pETSUMO vector in order to express the NP protein, or the amino and carboxy-terminal parts of HN glycoprotein for using in NDV immunodiagnosis. The NP and the amino and carboxy-terminal fragments of HN glycoprotein were expressed as fusion recombinant proteins containing SUMO peptide and poly-histidine tags. These proteins after purification in nickel-agarose resin, and biochemical and immunochemically characterization by SDS-PAGE and Western-blotting, demonstrated the ability to be recognized by polyclonal antibodies from SPF chickens infected with LaSota strain of NDV. The NP and amino and carboxy-terminal fragments of HN glycoprotein were used to develop indirect ELISA methods for using in chicken antibody detection. The assays were evaluated with a panel

of 120 chicken serum samples. The results showed comparable agreement, specificity and sensitivity. The recombinant NP-ELISA, amino-HN-ELISA and carboxy-HN-ELISA were capable to differentiate NDV positive from negative chicken sera and by comparing these ELISA methods with haemagglutination-inhibition test, high and significant correlations were detected, as well as high sensitivity and specificity were obtained, indicating that NP-ELISA, and amino-HN-ELISA and carboxy-HN-ELISA assays can be used for screening the presence of antibodies in NDV infected birds. In conclusion, the recombinant NP, amino and carboxy-terminal fragments of HN glycoprotein shared relevant epitopes with homologous and native viral proteins and have a great potential to be advantageously used in immunodiagnosis of NDV infection.

*Research supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (National Program for Animal Health; grant #578460/08-4).

‡All supported by fellowships for Technological and Industrial Development (DTI-3) from CNPq.

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Patologia Veterinária, Laboratório de Imunologia e Virologia
Rod. Prof. Paulo D. Castellane, s/no, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: heliojm@fcav.unesp.br

Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico da febre aftosa

Development of synthetic peptides for the diagnosis of foot and mouth disease

Ribeiro, E.L.^{1*}; Camargos, M.F.²; Sales, E.B.²; Oliveira, A.M.²; Franco, J.A.³; Ueira-Vieira, C.^{3**}; Goulart Filho, L.R.^{3**}; Heinemann, M.B.^{1**}

A febre aftosa é caracterizada por afetar diretamente o desenvolvimento econômico da indústria animal, com graves consequências sociais. Os testes atuais para diagnóstico e vigilância epidemiológica da febre aftosa são realizados com o polipeptídeo 3ABC recombinante, que, apesar de serem de boa eficiência, apresentam limitações, como o emprego apenas para avaliação de rebanhos e não para o diagnóstico individual. A EITB, a despeito de ser uma prova de alta sensibilidade e especificidade, requer um treinamento extensivo, a interpretação é subjetiva e o protocolo da prova não é totalmente padronizado. A utilização de peptídeos sintéticos pode trazer a vantagem da EITB, alta especificidade, com a vantagem do ELISA, alta sensibilidade, rapidez, padronização e automação dos testes. A presente proposta tem como objetivo o desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico para a febre aftosa. A partir de modelos descritos na literatura, foram desenhados três peptídeos sintéticos. Após o desenho, os peptídeos foram otimizados para expressão em *Pichia pastoris* (vetor pPIC9) a fim de eternizá-los. Após a expressão, os peptídeos foram purificados em HPLC e concentrados por meio de ultrafiltração tangencial com cartucho de retenção de 10 kDa. As proteínas purificadas foram testadas em *dot blot* com conjugado anti-histidina, devido ao fato do peptídeo ter como marcador uma cauda de poli-histidina. Em seguida, foram testadas em *dot blot* e Elisa com soros bovinos não vacinados, vacinados e infectados com o vírus da febre aftosa. Como resultados, obtivemos êxito em clonar e expressá-los em *P. pastoris* com um rendimento em torno de 100 µg/mL. O *dot blot* com anti-histidina foi positivo nos três peptídeos, indicando

que as proteínas purificadas eram os peptídeos desenhados antiaftosa. O resultado do teste de *dot blot* e Elisa utilizando anticorpos bovinos antifebre aftosa foram negativos, ou seja, os peptídeos não conseguiram diferenciar quais eram os animais negativos, vacinados e os infectados.

Apoio financeiro: CNPq (edital 64/2008 CNPq/Mapa/SDA).

*Bolsista Fapemig.

**Bolsista CNPq

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: mabryan@ufmg.br

²Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

³Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia, MG, Brasil.

Ações da defesa animal do IDARON em foco de raiva dos herbívoros no município de Espigão do Oeste, Rondônia – Relato de caso

A herbivorous rabies outbreak in Espigão do Oeste, Rondônia, Brazil – case report

Fuck, J.J.¹; Silva, S.G.²; Daher, D.O.^{3*}; Bruhn, F.R.P.^{3**}; Lopes, E.^{3***}; Hirsch, C.³; Rocha, C.M.B.M.³

A raiva é uma zoonose de alta relevância na saúde pública, que acarreta enormes perdas econômicas pela alta letalidade. O objetivo deste trabalho foi relatar o caso de um foco de raiva dos herbívoros ocorrido no município de Espigão do Oeste, Rondônia. Os levantamentos foram feitos com base nas informações encontradas nos arquivos do escritório da Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal (Ulsav) da Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (Idaron) no município de Espigão do Oeste e nos registros do sistema informatizado dessa agência (Sisidaron). Após notificação do produtor quanto à ocorrência da mortalidade de bovinos sob a suspeita de raiva dos herbívoros, procedeu-se ao deslocamento até a propriedade para investigação epidemiológica e clínica do foco. A suspeita foi confirmada por Imunofluorescência Direta (IFD). Traçou-se um raio de 4 km a partir da propriedade foco e outro de 12 km para identificação dos limites do perifoco, tendo cada região um padrão de ação específico. Em todas as propriedades na área de até 4 km de raio foram feitas notificações para vacinação assistida e seus respectivos acompanhamentos de reforços vacinais em 30 dias. As propriedades situadas no raio entre 4 e 12 km foram notificadas para vacinação e reforço, porém sem acompanhamento. Para o controle de transmissores, particularmente para morcegos hematofagos (*Desmodus rotundus*), as ações foram desencadeadas a partir da constatação de mordedura dos animais durante as notificações das propriedades ou por denúncia desse fato pelos produtores ao Idaron, identificação de abrigos e captura no foco. Foram realizadas atividades de educação sanitária, dentre as quais quatro entrevistas sobre o assunto em duas emissoras de rádio local. Por fim, tomadas as ações descritas, o foco foi extinto atendendo às expectativas legais, protegendo a saúde pública e animal, e evitando-se maiores perdas econômicas, portanto foram atendidos os reais objetivos da defesa sanitária animal.

Apoio financeiro: CNPq, Fapemig, Capes, UFLA e Mapa.

*Bolsista DTI-II/CNPq – edital 64/Mapa.

**Mestrado-Capes.

*** CNPq/PIBIC/ e ATP-A-A/CNPq – edital 64/Mapa.

¹Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia, Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal, Rua Acre, 2783, CEP 76974-000, Espigão do Oeste, RO, Brasil.

E-mail: jefff@hotmail.com

²Emater, Porto Velho, RO, Brasil.

³Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Banco de germoplasma de lentivírus caprino do Brasil

Germplasm bank of caprine lentivirus of Brazil

Pinheiro, R.R.¹; Azevedo, D.A.A.²; Feitosa, A.L.V.L.³; Dias, R.P.³; Andrioli, A.¹; Santiago, L.B.¹; Alves, F.S.F.¹; Minardi, J.C.^{4*}

Considerando as diferenças biológicas e moleculares significativas existentes entre amostras de lentivírus caprino (LVC), torna-se fundamental o estudo mais aprofundado das amostras virais já isoladas. A diversidade genética é considerada uma característica peculiar dos lentivírus e está provavelmente relacionada à diversidade do curso das lesões e epidemiologia da enfermidade. A formação de um banco de germoplasma de LVCs no Brasil poderá viabilizar o entendimento dessa diversidade, tornando-se essencial para o estabelecimento de programas de controle das lentivirose no País. O domínio das técnicas de isolamento e a caracterização, classificação, manutenção e propagação do material genético viral existente nos Estados da federação são outras vantagens obtidas com a implantação de um banco de germoplasma de LVCs no Brasil. Normas que garantam a patente de metodologias para os LVCs isolados serão mais facilmente implantadas e, por conseguinte, instituições de pesquisa brasileiras poderão regulamentar os processos de cessão e intercâmbio de cepas importantes para a economia nacional. O banco de germoplasma de LVCs objetiva desenvolver técnicas para a detecção e o controle da artrite-encefalite caprina (CAE), que acomete caprinos de todos os tipos raciais, idade e sexo, deprimindo os índices de produtividade geral da espécie, tornando o agronegócio da caprinocultura do País menos competitivo. Para o isolamento das cepas nativas de LVC, foi utilizada a técnica de cocultivo de leucócitos. A confirmação das amostras virais foi realizada através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Foram realizadas coletas de sangue de animais do Estado do Ceará (nove fazendas da região Norte, quatro fazendas da região Central e duas fazendas da região Metropolitana de Fortaleza), Piauí (duas fazendas da região Metropolitana de Teresina e dez fazendas da região do Gurguéia), Rio Grande do Norte (uma fazenda em Mossoró), Minas Gerais (uma fazenda) e Bahia (uma fazenda em Salvador). Após a confirmação da soropositividade pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), realizou-se nova coleta de sangue de 26 animais fortemente soropositivos. Desses animais, 22 cepas nativas do Ceará (Sobral e Fortaleza), Rio Grande do Norte, Piauí, Bahia e Minas Gerais foram isoladas. O isolamento foi confirmado pela presença de efeito citopático e PCR. A Embrapa Caprinos e Ovinos consolidou a construção de sua biblioteca de LVCs com o depósito das referidas amostras virais, que servirão para estudos futuros de epidemiologia molecular, bem como para a produção de antígenos nativos, preparo de kits de diagnóstico da CAE com cepas nacionais e até mesmo o estudo de vacinas para essa enfermidade.

*Bolsista de Pós-doutorado.

¹Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral-Groaíras, km 4, CEP 62010-970,

Sobral, CE, Brasil.

E-mail: rizado@cnpq.embrapa.br

²Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil.

³Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, Fortaleza, CE, Brasil.

Diagnóstico do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras de sêmen por RT-PCR convencional e cinética

Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in semen samples by conventional and RT-PCR and real time

Gasparini, M.R.^{1,2}; Carvalho, I.L.Q.¹; Oliveira, A.P.²; Barbosa, A.A.S.¹; Leite, R.C.²; Barbosa-Stancioli, E.F.¹

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno que infecta rebanhos bovinos do mundo inteiro, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*. A infecção por BVDV pode causar problemas gastrointestinais, respiratórios e reprodutivos, com conseqüente prejuízo para a pecuária nacional. Nesse contexto, destaca-se a infecção uterina gerando animais persistentemente infectados (PI), responsáveis pela manutenção do vírus nos rebanhos. Circulam nos rebanhos dois genótipos do BVDV (BVDV-1 e BVDV-2), pertencentes a dois biótipos (amostras citopatogênicas – CP – ou não citopatogênicas – NCP), dependendo do efeito em cultura celular, com diferentes graus de virulência. O sêmen de animais infectados se destaca como forma de transmissão viral na inseminação artificial (IA), monta natural ou pela transferência de embrião, sendo preconizada pela OIE a testagem do sêmen. O objetivo deste trabalho foi a padronização de um teste de PCR sensível e específico para o diagnóstico do BVDV em sêmen bovino. O BVDV-1 (ATCC NADL), expandido em células MDBK (CCL-22, ATCC) e cultivadas com 10% de soro fetal equino, foi utilizado para a extração do RNA total com Tri-reagente segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, produziu-se cDNA utilizando o kit Improm II (Promega®), seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se iniciadores específicos que ancoram na região 5'UTR (290 pb), região conservada dos *Pestivirus*. O *amplicon* foi clonado em vetor plasmidial pGEM-T-easy seguido de sequenciamento para a confirmação da especificidade do teste. A sensibilidade do teste foi aferida com o plasmídeo diluído na base 10, tendo sido a detecção observada até 44 fentogramas. Em seguida, o teste foi repadronizado em passo único (RT-PCR) para aumentar a sua rapidez e eficiência, utilizando-se um kit. Foram testadas 12 amostras clínicas de sêmen bovino provenientes de um único rebanho, tendo apresentado 83,3% de positividade (10/12). O passo seguinte foi a padronização da PCR para o sistema cinético (PCR em tempo real). O plasmídeo produzido foi então linearizado com o enzima de restrição Sal I e purificado do gel. A PCR foi padronizada com o uso do corante *Syber Green*, e os resultados mostraram um *slope* -3,341 e eficiência de 99,194%. Tanto o teste de PCR convencional quanto o de PCR cinético desenvolvidos mostraram-se eficientes para o diagnóstico do BVDV em sêmen, destacando-se o seu uso em programas de controle.

*Instituição financiadora: CNPq / Mapa, Capes, Fapemig.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: marcelagasparini@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Diagnóstico de herpesvírus bovino (BoHV-1 e BoHV-5) em sêmen

Diagnosis of bovine herpesvirus (BoHV-1 and BoHV-5) in semen

Gasparini, M.R.^{1,2}; Carvalho, I.L.Q.¹; Oliveira, A.P.²; Barbosa, A.A.S.¹; Leite, R.C.²; Barbosa-Stancioli, E.F.¹

Os herpesvírus bovinos pertencem à família *Herpesviridae*, tendo como característica principal o estabelecimento de latência com posterior reativação viral causada por fatores como estresse e uso de corticoide. Devido a essa capacidade, os animais infectados eliminam vírus de maneira intermitente em excreções e secreções corpóreas, necessitando-se de ferramentas diagnósticas sensíveis e específicas para os programas de controle. Os herpesvírus bovinos apresentam distribuição mundial, tendo grande importância econômica para a pecuária brasileira, destacando-se o Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e balanopostite e vulvovaginite pustular infecciosa (IPB/IPV), e o Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), que cocircula nos rebanhos juntamente com o BoHV-1, induzindo quadros de encefalite, além de quadros respiratórios e reprodutivos. Devido à importância crescente da inseminação artificial no Brasil, e sendo o sêmen uma via de transmissão importante, este trabalho tem como objetivo a elaboração de um teste diagnóstico molecular rápido e específico para a detecção do BoHV-1 e BoHV-5 em sêmen bovino. Amostras virais padrão foram cultivadas em células CRIB e o DNA total foi extraído com Tri-reagente segundo instruções do fabricante. Padronizou-se uma PCR utilizando iniciadores para a amplificação do gene viral codificador da glicoproteína G (495pb para BoHV-1.1, 1.2 e 531pb para BoHV-5) e do gene normalizador GAPDH (97pb). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e observaram-se *amplicons* nos tamanhos moleculares esperados para cada gene. Foi produzido um plasmídeo contendo os genes viral e normalizador e os insertos foram conferidos por sequenciamento gênico. A PCR foi então repadronizada como duplex (gG + GAPDH) com sucesso, variando-se condições de extrinsecência e de concentração dos iniciadores para os dois distintos genes. O teste mostrou alta sensibilidade (detecção de 400 fentogramas de inserto) e a especificidade foi avaliada com outros herpesvírus animais e humanos pertencentes à mesma família, tendo amplificado somente BoHV-1 e BoHV-5. A PCR duplex desenvolvida foi utilizada com sucesso em amostras clínicas de sêmen bovino provenientes de um rebanho de animais soropositivos para BoHV-1 e BoHV-5, evidenciando o seu uso para triagem de sêmen.

*Instituição financiadora: CNPq / Mapa, Capes, Fapemig.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: marcelagasparini@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Vaccinia virus: presença de DNA viral no leite de vacas experimentalmente infectadas

Vaccinia virus: presence of viral DNA in Milk of experimental infected cows

Oliveira, T.M.L. DE¹; Rehfeld, I.S.¹; Matos, A.C.D.¹; Rivetti Junior, A.V.¹; Guedes, M.I.M.C.¹; Abrahão, J.S.²; Kroon, E.G.²; Lobato, Z.I.P.¹

A *Vaccinia bovina* (VB), zoonose emergente, causada pelo *Vaccinia virus* (VACV) é caracterizada pelo surgimento de lesões ulceradas no teto das vacas em lactação e nas mãos e braços de ordenhadores. A partir da década de 1990, o número de casos de VB vem crescendo, sendo hoje identificados surtos em quase todos os estados brasileiros. A doença é subnotificada e as medidas de contenção necessárias para o seu controle são frequentemente desconhecidas, favorecendo a disseminação da doença. Os prejuízos econômicos relacionados à VB estão associados principalmente à queda brusca na produção do leite, presença de infecções secundárias e aumento dos gastos com medicamentos. Estudos prévios revelaram a presença tanto de DNA, quanto de partículas virais infecciosas do VACV, no leite de vacas doentes em surtos de VB em Minas Gerais, chamando a atenção para o potencial risco à saúde pública. Porém, permanecem desconhecidos o perfil de eliminação do vírus no leite de vacas acometidas e a origem das partículas virais presentes no leite. Este trabalho objetivou pesquisar a presença do DNA viral através da técnica de PCR, em leite de animais experimentalmente infectados, e de estabelecer o período e o perfil de eliminação do vírus no leite. Oito vacas mestiças em lactação, soronegativas para o VACV, foram inoculadas com VACV, amostra GP-2 (isolada de surto de VB ocorrido no município de Guarani, MG), na concentração de 106 PFU/50 µL. Os tetos foram escarificados com lixa, sendo que o teto posterior esquerdo (TPE) de cada vaca não foi inoculado, servindo de controle negativo. Amostras de leite foram coletadas durante 32 dias ininterruptos e alternados até o 60º dia, sendo os dias pares coletados com uma sonda estéril e os dias ímpares através de ordenha manual. Todas as amostras foram submetidas à PCR para o gene *vgf*. Entre o segundo e o quarto dia pós-infecção (DPI), todos os tetos, com exceção do TPE, apresentaram lesões típicas de VB que cicatrizaram em média após 21 dias. Foi possível detectar a presença de DNA viral no leite a partir do terceiro DPI e, de forma intermitente, até o sexagésimo dia. O leite derivado dos tetos inoculados do controle (TPE), de todas as oito vacas, apresentaram, em algum momento, DNA viral. Além disso, indiferentemente da forma de coleta (manual ou com sonda), foi possível detectar o DNA viral no leite. Esses resultados mostram que o vírus pode ser eliminado de forma intermitente no leite durante e após a fase aguda da doença, mesmo após a cicatrização total das lesões, sugerindo uma possível infecção sistêmica e persistente.

Financiamento: CNPq/Mapa, Fapemig, Capes.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: ziplobato@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Bovine vaccinia, a systemic infection: evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs

Vaccinia bovina, uma infecção sistêmica: evidencia de eliminação nas fezes, viremia e detecção do vírus em órgãos linfóides

Rivetti Junior, A.V.¹; Guedes, M.I.M.C.¹; Oliveira, T.M.L. De¹; Rehfeld, I.S.¹; Matos, A.C.D.¹; Rodrigues, N.F.S.¹; Abrahão, J.S.²; Kroon, E.G.²; Lobato, Z.I.P.¹

Bovine vaccinia (BV) is an occupational zoonosis caused by *Vaccinia virus*

(VACV), which affects dairy cattle and milkers. In bovine natural infections, it seems that BV is a localized disease, with cutaneous lesions restricted to the teats. However, there are no studies about experimental infection with VACV in bovines to establish its pathogenesis and elimination pathways. The aim of this study was to study the occurrence of viremia and elimination of VACV in bovine feces. Eight crossbred lactating cows, serologically negative for VACV, were used. Teats were previously scarified with sand paper and then inoculated with 106 pfu/100 µL of Guarani P2 (GP2) strain of VACV. Blood samples and feces were collected daily throughout the experiment. After 66 days post inoculation (d.p.i) the animals were divided into two groups that receive two new different treatments. One group was re-inoculated with the same inoculum and the other was subjected to chemical immunosuppression, to evaluate whether re-infected animals and/or experimentally infected animals that recover from previous lesions in conditions of immunosuppression could eliminate VACV on feces once more. Animals from both groups were monitored for up the 89th day post initial inoculation. Viral DNA was continuously detected and quantified in blood and feces of these animals in an intermittent way, even after the resolution of the lesions. At slaughter, tissues were collected and the viral DNA was detected and quantified from mesenteric and retro mammary lymph nodes, ileum, spleen and liver. The detection of VACV DNA in blood and feces for long period and its detection in lymphatic organs provide new evidence about VACV elimination and suggest, for the first time, that BV could be a persistent systemic infection.

Financial support: CNPq/Mapa, Fapemig, Capes.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: ziplobato@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Simplifying science and technology to clarify and ask the rancher from Rio de Janeiro state everything about rural rabies*

Descomplicando a ciência e a tecnologia para esclarecer e perguntar ao pecuarista fluminense tudo sobre a raiva rural

Meireles, M.A.D.; Pereira, S.R.F.G.; Bernardo-Pedro, T.; Florido, V.A.; Oliveira, A.C.; Linhares, J.M.; Vieira, L.F.P.; Chicarino, C.N.

Rabies is a contagious disease of great interest to the livestock and public health. The etiologic agent is a neurotropic virus (family *Rhabdoviridae* and genus *Lyssavirus*), which affects the central nervous system. The disease has an anthroponotic character, and all mammals may be infected and develop it. Rabies affects domestic herbivores (livestock), and its main transmitter, in rural areas, is the “common vampire bat”, *Desmodus rotundus*. This research aimed at education in health and surveillance of rabies, in a simple and playful, to the cattle ranchers of the Northern and Northwestern regions of Rio de Janeiro State, clarifying aspects about rural rabies. The following municipalities/locations were visited: Batatal, Boa Vista, Cardoso Moreira, Caxeta, Dolores de Macabu, Espírito Santinho, Hatobá, Italiana, Italva, Pedra Santa, Santa Maria,

São Francisco de Itabapoana and Vila Nova. Both Emater-Rio and Núcleo de Defesa Agropecuária (NDA) of Campos dos Goytacazes, RJ, participated in all visits. A total audience of over 100 farmers, including producers (ranchers) and rural workers (animal handlers), were served. The theme was approached by means of folders, lectures and questionnaires to the target audience. The following data was revealed: 20% of the producers reported suspected cases of rabies on their property, in the last five years; of these, 50% did not send samples for laboratory examination. 74% reported the presence of bats on their property and 75% noticed signs of aggression in animals. Towards the control of bats, 30% of the producers searched for their shelters to exterminate the colonies, 20% were applying the “vampiricid topic” on attacked animals and 60% sought their NDA. Regarding the transmission of rabies, 75% believed that only the vampire bats could do it, 15% believed that human beings may not contract the disease and 70% knew which animals could convey it. In suspected cases of rabies, 60% of the producers contacted the NDA, 35% slaughtered the sick animals and 5% tried to treat them. As regards rabies vaccination, 20% have never used the vaccine and 80% vaccinated their flock; of these, 50% semiannual, 43.3% yearly and 6.2% in the outbreaks. Rural rabies has been emerging due to lack of vaccination and increasing bat attacks. The lack of knowledge and even negligence on the part of producers should be considered. Leading information to the cattle rancher is the best way for prevention and control of rural rabies. As greater as the number of people served, the lower was the losses caused in the livestock economy and the risks to human beings.

*CNPq/Mapa/SDA Auxílio Financeiro Edital N° 064/2008. CNPq Bolsas. Proex-UENF Bolsas.

Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia e Víruses
Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.
E-mail: marcosadmeireles@yahoo.com.br

Estimating vulnerability to foot-and-mouth disease using stochastic disease simulation in farms and records of movements of animals

Estimando a vulnerabilidade de propriedades à febre aftosa a partir de simulação estocástica de espalhamento de doenças integrado do uso de registros das guias de trânsito animal (GTA)

Costa, M.A.¹; Pena, C.P.^{1*}; Gomes, A.S.^{2*}; Assunção, R.M.¹

Brazil is one of the major producers of beef and one of the main suppliers to the European Union and other countries. Due to major efforts of the Ministry of Agriculture and Livestock, Brazil currently has a zone free of foot-and-mouth disease in approximately 60% of the national territory. The zone free of foot-and-mouth borders some neighboring countries which do not share an efficient disease surveillance system and, although major efforts are done to mitigate disease entry, it is of interest to investigate more vulnerable routes for diseases. The movement of live animals throughout the Brazilian territory is currently documented in electronic form through the issue of transit animal guides (GTAs). Geographical information about the location of farms, number of transported animals, date of issue of the GTAs, are available in the dataset. From these records, we simulate the spread of foot-and-mouth disease. An infected animal is randomly placed into one of the farms and stochastic models are used to spread the disease among the herd. New farms

become contaminated following the entry of infected animals. Movement is represented using a directed network where the farms are represented by vertices (or nodes) and the movements of animals between farms are the edges. To simulate the transmission of disease, three epidemiological stochastic models of SIR (Susceptible-Infected-Recovered) type are used. The simplest model, named farm level, uses the farm as the basic epidemiological unit. The other two models, named Greenwood and Reed-Frost models, simulate the transmission of the disease using the animals within the farms as the basic epidemiological units. The animal level simulation generates the distribution of the daily number of infected farms and the daily number of infected animals during an epidemic cycle. The time period of the simulation is 28 days and the probability of a susceptible animal being infected by an infected animal was set as 0.4. From simulated results, and using network theory, it is possible to estimate the vulnerability of each farm and to identify those trajectories within the network most likely to spread the disease. In the network representation, the vulnerability of a vertex is the proportion of the simulations in which the vertex finishes the simulation period in the infected state. The vulnerability of an edge is the proportion of simulations in which both vertices, connected by the edge, appear simultaneously infected.

*Bolsista.

Financiamento: Grant MCT/CNPq/Mapa/SDA 64/2008-1, n° 578469/2008-1.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Estatística, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: macosta.est@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Eletrônica, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Fatores determinantes da frequência e qualidade das notificações de doenças vesiculares dos ruminantes no Mato Grosso do Sul*

Determinants of the frequency and quality of notifications of vesicular diseases of ruminants in Mato Grosso do Sul, Brazil

Francisco, P.F.C.¹; Gonçalves, V.S.P.¹; Fontana, I.¹; Ferreira, F.³; Pantoja, M.J.⁶; Moraes, G.M. de²; Barbosa, H.V.B.²; Mourão, M.L.P.²; Chiochetta, L.⁴; Bueno, R.⁴; Cazola, E.P.⁵

O Mato Grosso do Sul é reconhecido como Estado livre da febre aftosa com vacinação. A manutenção e a credibilidade dessa condição sanitária dependem da existência de um sistema de vigilância eficiente, no qual se inclui a notificação regular de suspeitas de enfermidades vesiculares. No entanto, o número de notificações é muito baixo no Estado, tornando difícil a avaliação da sensibilidade dessa atividade de vigilância. O presente trabalho teve como objetivo identificar fatores que determinam a qualidade e quantidade de notificações de doenças vesiculares no Mato Grosso do Sul, sobretudo aqueles relacionados à percepção dos atores sociais participantes do processo. Inicialmente, realizaram-se 19 entrevistas exploratórias, com perguntas abertas, dirigidas a funcionários de frigoríficos e do Iagro, a funcionários de lojas veterinárias, a propriedades rurais, a assentamentos e a veterinários particulares, as quais foram submetidas à análise lexical pelo software Alceste. A análise lexical revelou que os entrevistados conhecem os sinais clínicos da doença, mas tendem a procurar terceiros antes de notificar algum evento suspeito. A maioria compreende também a rápida difusão e impacto econômico da febre

afetosa. Os pecuaristas reconhecem a competência do serviço veterinário oficial, mas julgam que faltam meios de ação à defesa sanitária do Estado. Esses resultados fundamentaram a elaboração de um questionário que serviu de base a um inquérito por amostragem envolvendo os municípios de Rio Verde de Mato Grosso, Três Lagoas, Dourados, Eldorado e Ponta Porã. Os resultados indicaram que o conhecimento sobre a doença está associado ao grau de escolaridade. A falta de conhecimento sobre diagnósticos diferenciais contribuiu para que a frequência de notificação de suspeita seja baixa. Ficou evidente o papel-chave que o veterinário particular pode ter em uma notificação de suspeita, já que os pecuaristas e seus funcionários tendem a procurá-lo antes de chamar o serviço veterinário oficial. Os produtores rurais entendem que a vigilância de febre aftosa é papel das autoridades públicas, não reconhecendo a sua própria importância como sensor do sistema. Em conclusão, o Sistema de Vigilância da Febre Aftosa deve aumentar a frequência de notificações de suspeitas de doenças vesiculares, melhorando a conscientização e participação de produtores, trabalhadores rurais e veterinários quanto à importância da manutenção níveis altos de alerta, aprimorando-se a compreensão do processo de notificação e os registros das ações tomadas.

Auxílio financeiro: CNPq.

¹Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Instituto Central de Ciências, CP 4508 CEP 70910-970, Brasília, DF, Brasil.

²Mapa, SDA, DAS, Brasília, DF, Brasil.

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Iagro, Campo Grande, MS, Brasil.

⁵SFA/MS, Campo Grande, MS, Brasil. ⁶Propaga, Brasília, DF, Brasil.

Inquérito sorológico da infecção pelos lentivírus de pequenos ruminantes em rebanhos de caprinos e ovinos de quatro mesorregiões do Estado do Ceará, Brasil

Serologic survey of small ruminants lentivirus in goat and sheep flocks regions of Ceará State, Brazil

Alves, F.S.F.¹; Santiago, L.B.¹; Lima, A.M.C.²; Farias, D.A.^{1*}; Pinheiro, R.R.¹; Cavalcante, A.C.R.¹

O Brasil possui um grande potencial de mercado para os produtos derivados de caprinos e ovinos, apresentando condições favoráveis para a produção de alimentos de alto valor biológico e pele de excelente qualidade. Apesar da dimensão territorial e das condições ambientais propícias ao desenvolvimento da atividade, altos índices de mortalidade e morbidade têm sido observados no rebanho brasileiro de pequenos ruminantes. Estudos epidemiológicos para avaliação de riscos e impacto das enfermidades são limitados pela falta de dados relativos registrados nos criatórios de caprinos e ovinos do Brasil e pelo desconhecimento da sua real situação zoossanitária. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência da artrite-encefalite caprina (CAE) e da maedi-visna em quatro mesorregiões do Estado do Ceará (região metropolitana de Fortaleza, Norte, Noroeste e Sertões Cearenses). Foram coletadas amostras de sangue de 710 caprinos e 840 ovinos pertencentes a 59 propriedades distribuídas em 17 municípios do Estado (Horizonte, Aquiraz, Caucaia, Eusébio, Pacajus, São Gonçalo do Amarante, Beberibe, Canindé, Santa Quitéria, Granja, Sobral, Parambu, Tauá, Independência, Quixadá, Quixeramobim e Banabuiú).

A coleta de sangue foi realizada no período de julho de 2010 a abril de 2011. As amostras de soro foram testadas quanto à presença da infecção pelos lentivírus de pequenos ruminantes, através da técnica de imunodifusão em gel de ágar, utilizando-se o kit de diagnóstico para CAEV, com antígeno CAEV Cork, produzido na Embrapa Caprinos e Ovinos. Na mesorregião Metropolitana de Fortaleza, 13,5% (24/178) dos caprinos avaliados apresentaram resultado positivo para CAE, sendo que 89% (8/9) das propriedades estavam infectadas. No Norte Cearense, 11,25% (9/80) dos caprinos foram identificados como soropositivos. Nesse caso, 50% (2/4) das propriedades avaliadas estavam infectadas. Já nas mesorregiões do Noroeste e dos Sertões Cearenses, a prevalência da CAE foi menor que 0,5% (1/218) e 0% (0/234), respectivamente. Nenhum dos ovinos avaliados neste estudo apresentou resultado positivo para maedi-visna. A mesorregião metropolitana de Fortaleza e o Norte cearense são importantes bacias leiteiras do Estado. A alta ocorrência da CAE nessas mesorregiões pode ser explicada pela grande concentração de animais especializados para a produção leiteira e predominância do sistema intensivo de criação. Diferentemente da CAE, o vírus da maedi-visna encontra-se menos disseminado no Brasil, provavelmente pelo tipo racial do rebanho envolvido no estudo (animais nativos, mestiços ou sem raça definida) e pelo sistema extensivo de criação prevalente no Estado. Nesse sentido, fica explícita a necessidade de implantação de um programa de controle das lentiviroses de pequenos ruminantes no País para controlar a disseminação do agente no rebanho nativo brasileiro.

*Bolsista DTI do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brasil.

¹Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral-Groaíras, km 4 CEP 62010-970, Sobral, CE, Brasil.

E-mail: selmo@cnpq.embrapa.br

²Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil.

Capacitação técnica de pesquisadores do Instituto Biológico (IB) para o diagnóstico de laringotraqueite infecciosa das aves (LTI)

Technical training of a team of scientific researchers from Instituto Biológico (IB) to perform the Infectious Laryngotracheitis (ILT) diagnosis

Soares, N.M.¹; Buim, M.R.¹; Del Fava, C.²; Ikuno, A.A.²; Luciano, R.L.³

A capacitação de profissionais proporciona o conhecimento necessário para a padronização de procedimentos técnicos e científicos referentes ao diagnóstico de enfermidades, principalmente as doenças aviárias, já que o Brasil é grande produtor e exportador de produtos avícolas. O objetivo do projeto, financiado pelo CNPq, foi promover a capacitação dos profissionais do Instituto Biológico (IB) para as técnicas de diagnóstico recomendadas oficialmente para LTI. Os treinamentos foram realizados no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro) do Ministério da Agricultura e no Centro de Referência Internacional de Pesquisa e Diagnóstico das Doenças Aviárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Geórgia. O diagnóstico foi implantado nos laboratórios do IB para auxiliar a execução das atividades do programa oficial de controle e erradicação da LTI na região de Bastos (SP) e também para atender à demanda gerada pela necessidade das empresas de exploração comercial de aves. Os técnicos foram treinados para execução de sorologia (ELISA e IDGA), histopatologia, PCR e isolamento viral. No Lanagro,

foi realizado o treinamento para as análises de ELISA e imunodifusão, e em seguida quatro pesquisadores, foram treinados na Universidade da Geórgia. Uma pesquisadora recebeu o treinamento para o diagnóstico anatomopatológico, que busca a identificação da inclusão viral eosinofílica no núcleo das células epiteliais da mucosa conjuntiva e do trato respiratório, sendo essa lesão patognomônica em aves enfermas no estágio inicial da doença (cinco a sete dias após a infecção). Os trabalhos de biologia molecular foram executados segundo o diagnóstico da LTI pela PCR convencional e em tempo real, tendo em vista que são provas rápidas, específicas e sensíveis. Toda a base teórica da PCR foi recordada e com as amostras de raspado de traqueia de aves enfermas, realizou-se um protocolo de extração de DNA, utilizando-se o kit QUIAGEN e, em seguida, foi realizada uma reação de PCR em tempo real e uma de PCR convencional, sendo comparada a sensibilidade analítica de ambas as técnicas. Com base nos resultados, concluiu-se que o protocolo da PCR convencional pode ser aplicado com segurança no diagnóstico da LTI no Brasil, assim como a PCR em tempo real. Para o isolamento viral, dois pesquisadores utilizaram a cultura primária de células de rim de galinha SPF, de três semanas de idade, para observação do efeito citopático característico do vírus e ovos embrionados de galinha SPF de 9-11 dias, inoculados por via membrana corioalantoide (MCA). Os ovos foram incubados e examinados diariamente, para observação do espessamento e formação de lesões tipo *pocks*, na MCA.

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos
Av. Gaspar Ricardo, 1700, CEP 17690-000, Bastos, SP, Brasil.
E-mail: nilcemarias@gmail.com

²Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

³Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Descalvado, SP, Brasil.

Detecção e caracterização do vírus de laringotraqueite infecciosa em um surto em aves de postura no Estado de São Paulo, Brasil*

Detection and characterization of infectious laryngotracheitis virus in an outbreak in laying hens from the state of São Paulo, Brazil

Luciano, R.L.¹; Buim, M.R.²; Del Fava, C.³; Ikuno, A.A.³; Harakava, R.⁴; Ishizuka, M.M.⁵; Buchala, F.G.⁶; Ferreira, A.J.P.⁷; Soares, N.M.²

Laringotraqueite infecciosa das aves (LTI) é uma doença respiratória aguda e altamente contagiosa, causada pelo *Herpesviridae*, *Gallid herpesvirus 1*. Essa enfermidade é responsável por um alto nível de mortalidade e redução na produtividade, em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi descrever a caracterização molecular do vírus LTI, envolvido em um surto que ocorreu em aves de postura em Guataporã, Estado de São Paulo, Brasil. Em dezembro de 2009, ocorreu uma doença respiratória aguda, com a presença de muco hemorrágico na traqueia, no final do inverno e início da primavera de 2010, o qual foi reportado ao Serviço Estadual de Saúde Animal. Dezenove pools de amostras (três cabeças/pool) provenientes de oito lotes com sintomas clínicos e suspeita epidemiológica de LTI foram coletados. Essas amostras foram analisadas por histopatologia e PCR convencional. De 19 lotes estudados, a análise histopatológica revelou a presença de células sinciciais com corpúsculos de inclusão no epitélio traqueal em 57,9% (11/19) das amostras. A presença do vírus foi demonstrada por técnicas moleculares: PCR convencional

e sequenciamento parcial do gene ICP4 (688 bp). Treze amostras de campo foram positivas no PCR (68,4%). Dessas, nove (69,2%) foram confirmadas pela histopatologia. Adicionalmente, o DNA das 13 amostras de campo foi sequenciado, revelando uma deleção de nove nucleotídeos (nt) na posição 734-742 e uma inserção de 12 nt (posição 271-283) na sequência viral. Esse perfil foi diferente das amostras disponíveis no GenBank (número de acesso EU104909) e das duas vacinas comerciais: CEO Nobilis-ILT/Intervet (número de acesso FJ477351) e TCO LTI-IVAX/Schering-Plough (número de acesso FJ477349). A associação da histopatologia e das análises moleculares foi importante para o diagnóstico agudo e crônico da LTI nos lotes estudados. O PCR foi altamente sensível na detecção do vírus da LTI, enquanto a histopatologia foi específica na identificação das lesões características desse agente. A estirpe viral encontrada em Guataporã foi geneticamente diferente das vacinas comerciais e outras amostras de campo detectadas em outros surtos no Brasil. Esses resultados são importantes ferramentas laboratoriais para o diagnóstico da LTI, servindo como base para a adoção de medidas de controle por parte do programa oficial de sanidade avícola.

*Suporte financeiro: CNPq (Processo N° 578354/2008-0).

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil.
E-mail: rlucaiano@biologico.sp.gov.br

²Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos, Bastos, SP, Brasil.

³Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Comitê Estadual de Sanidade Avícola, São Paulo, SP, Brasil. ⁶Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Campinas, SP, Brasil.

⁷Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, São Paulo, SP, Brasil.

Caracterização de um modelo murino para avaliação clínica e anatomopatológica de camundongos experimentalmente infectados com o vírus da encefalite de Saint Louis

Characterization of a murine model for clinical and pathological evaluation of mice experimentally infected with the Saint Louis encephalitis virus

Costa, E.A.^{1*}; Rosa, R.¹; Oliveira, T.S.²; Furtini, R.²; Paixão, T.A.³; Santos, R.L.¹

O recente isolamento do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) em um equino que apresentou sinais neurológicos no Estado de Minas Gerais objetivou a necessidade da caracterização *in vivo* desse arbovírus no País, visto seu amplo potencial epidêmico e epizootico. Estoques virais foram produzidos por inoculação do homogeneizado do tecido cerebral do equino infectado pelo SLEV em células de mosquito da linhagem C6/36. Sete grupos de seis camundongos suíços neonatos foram infectados via intracerebral (ic) com o estoque viral a uma concentração de 1.0×10^3 FFU C6/36/ $4 \mu\text{L}$ /camundongo. Os tecidos cerebrais dos animais que vieram a óbito ou que foram sacrificados sete dias pós-infecção (dpi) foram homogeneizados (pool), clarificados, filtrados e utilizados como inóculo para o segundo grupo de camundongos (P2) e assim sucessivamente

até a sétima passagem (P7). A suspensão 10% resultante por passagem foi utilizada para a detecção do RNA viral por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). O SNC e os órgãos de dois animais por passagem foram fixados em formol tamponado a 10%, processados segundo a técnica de inclusão em parafina e corados com hematoxilina e eosina. Alterações vasculares como hipermia e hemorragia foram visualizadas no SNC durante a terceira passagem (P3) em cérebros de camundongos, assim como alterações circulatórias sistêmicas caracterizadas por edema subcutâneo de membros e necrose de extremidades. A partir da quarta passagem (P4), alterações comportamentais, variando de hiperexcitabilidade à apatia, começaram a ser observadas com progressiva evolução até a evidência de sinais neurológicos, identificados por andar em círculos e perda da propriocepção dos animais. Evidente tendência à hemorragia ocorreu a partir da quinta passagem, com ocorrência de hemoperitônio e hematomas subcutâneos, associados ao diagnóstico histológico de hemorragia multifocal acentuada em fígado, coração, rim e pulmão. Durante o estudo, a mortalidade dos camundongos infectados se deu entre o 2º e 3º dpi, chegando a 100% na última passagem (P7). O grupo controle, inoculado com PBS 10%, não apresentou qualquer alteração clínica, macroscópica ou histológica significativa. Amostras de SNC e pool dos órgãos que apresentaram alterações vasculares foram positivas pela RT-PCR específica para SLEV. No presente estudo, manifestações hemorrágicas sistêmicas, característica de outros flavivírus, como o vírus da dengue, foram observadas nos camundongos inoculados com o SLEV. Sinais hemorrágicos associados ao SLEV foram descritos pela primeira vez, no Brasil, durante um surto de Dengue sorotipo 3, em humanos. O processo de adaptação do SLEV em modelo murino permitiu a caracterização da cepa isolada, pela primeira vez no Brasil, a partir do SNC de um equino e confirmou que, além de ser potencialmente neurovirulenta, causando encefalopatia, também está associada a quadros de vasculopatia sistêmica.

*Bolsista DTI-1 do Edital CNPq/Mapa/SDA No 064/2008, projeto 578385/2008-2.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

²Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil. ³Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Diagnóstico epidemiológico e medidas de controle adotadas pelo serviço oficial em um surto de laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI) no Estado de São Paulo, Brasil

Epidemiological diagnosis and control measures adopted by the official service in an outbreak of Infections Laryngotracheitis (ILT) of poultry

Buchala, F.G.¹; Ishizuka, M.M.^{2*}; Leite, L.O.¹; Dal Farra M.C.T.¹; Ferreira, J.P.³

A LTI, doença de ocorrência esporádica no Brasil, foi diagnosticada em 2003 com o primeiro caso em aves de postura de ovos comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo (SP), principal região de produção de ovos do país. Um programa de controle foi implantado com a criação de um bolsão (zona de proteção + zona de vigilância), com interdição das propriedades, proibição do trânsito de aves de descarte e dejetos, medidas de biossegurança e introdução de um programa oficial de vacinação massal com uso de vacinas vivas. O último caso foi observado em maio de 2004 e a doença foi considerada

controlada na região. Em 2008, novos casos foram notificados nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Federal e controlados sem uso de vacinas, sendo as principais medidas a interdição das propriedades, abate sanitário das aves, limpeza, desinfecção e vazios sanitários. Este trabalho tem por objetivo reunir ferramentas do diagnóstico epidemiológico (sistema de vigilância passiva com a notificação de ocorrência de doenças, formulários e questionários de investigação epidemiológica, indicadores de saúde, indicadores de produtividade), sinais clínicos de doença respiratória, achados anatomopatológicos, monitoramento sanitário com a utilização de critérios de amostragem, uso das diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial (sorologia ELISA e IDGA, histopatologia, PCR e isolamento). Os resultados obtidos pelas diferentes ferramentas epidemiológicas proporcionaram aos médicos veterinários do SVO de SP a interpretação e obtenção de amplo diagnóstico de situação, com o conhecimento da prevalência (infecção/doença), distribuição geográfica e impacto econômico, que proporcionaram o estabelecimento de medidas compulsórias de profilaxia: delimitação de zona infectada, interdição das propriedades, desinfecção dos veículos, controle do trânsito de aves e ovos, abate sanitário em dois lotes do foco índice, compostagem, proibição da muda forçada, uso de TCO vacinas, vigilâncias ativa e passiva. A doença está controlada com vacinação. A base legal foi constituída pela Portaria CDA nº 6 de 02/11/2011 (estabelece as medidas de profilaxia inespecíficas e específicas para o controle da laringotraqueíte infecciosa das aves, a serem cumpridas pelos estabelecimentos avícolas de postura de ovos comerciais localizados no município de Guataporã e dá outras providências) e Resolução SAA nº58 de 12/14/2010 (estabelece as medidas de profilaxia inespecíficas e específicas para o controle da laringotraqueíte infecciosa das aves, a serem cumpridas pelos estabelecimentos avícolas de produção de ovos comerciais, localizados no município de Guataporã e dá outras providências).

*Comitê de Sanidade Avícola de São Paulo.

¹Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Av. Brasil, 2340, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil. ²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, Brasil.

Encefalites equinas em Minas Gerais e o primeiro isolamento do vírus da encefalite de Saint Louis no Brasil

Equine Encephalitis in Minas Gerais State and the first isolation of Saint Louis Encephalitis virus in Brazil

Costa, E.A.^{1*}; Rosa, R.¹; Oliveira, T.S.²; Furtini, R.²; Paixão, T.A.³; Santos, R.L.¹

Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) é o órgão responsável pela execução dos programas sanitários do Mapa. Anualmente, o Laboratório de Saúde Animal do IMA (LSA/IMA) recebe aproximadamente cem amostras de sistema nervoso central de equídeos com sinais neurológicos. Cerca de 36% dessas amostras são positivas para raiva. Logo, grande parte dos casos necessita de diagnóstico diferencial. Em 2004, o LSA/IMA implantou o diagnóstico histopatológico das enfermidades neurológicas. Com isso, outras enfermidades puderam ser diagnosticadas em amostras negativas para raiva. Porém, testes mais específicos ainda são necessários para aumentar a acurácia do diagnóstico e permitir a identificação do agente etiológico envolvido. De janeiro de 2009 a janeiro de 2011, um levantamento dos casos de encefalite e encefalomielite em equinos no Estado de Minas Gerais foi realizado em

amostras de sistema nervoso central (SNC) de equinos que morreram apresentando sinais neurológicos e tiveram amostras colhidas e enviadas para o LSA/IMA. Nove diferentes agentes que causam doença neurológica em equinos foram pesquisados: raiva, herpesvírus equino 1 (EHV-1), herpesvírus equino 4 (EHV-4), vírus da encefalite equina do leste (EEEV, do inglês *Eastern equine encephalitis virus*), vírus da encefalite equina do oeste (WEEV, do inglês *Western equine encephalitis virus*), vírus da encefalite venezuelana (VEEV, do inglês *Venezuelan equine encephalitis virus*), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV, do inglês *Saint Louis encephalitis virus*), vírus da encefalite de West Nile (WNEV) e *Sarcocystis neurona*, agente da mieloencefalopatia protozoária. Das 217 amostras de SNC, 47 (21,7%) foram positivas para o vírus da raiva pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos. Nas 170 amostras restantes, negativas para o vírus da raiva, o DNA do EHV-1 foi detectado em 20 (11,8%) e o cDNA do SLEV em uma amostra, pelas técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), respectivamente. Das amostras de SNC acondicionadas em formol, 10% foram avaliadas histologicamente. Alterações circulatórias como hiperemia e hemorragias multifocais, associadas ou não a trombo vascular, foram frequentes nas infecções por EHV-1 e raiva e obtiveram diferença significativa quando comparadas com os animais negativos. Para confirmar o diagnóstico, os produtos de PCR obtidos foram sequenciados e os vírus isolados em cultivo celular. O presente estudo demonstrou que o vírus da raiva é o principal agente causador de encefalite em equinos, apesar do crescente número de casos de encefalomielite associados ao EHV-1 no Estado de Minas Gerais. No entanto, apesar de evidências sorológicas comprovarem a circulação do SLEV no Brasil, este foi o primeiro relato de isolamento do SLEV do sistema do SNC de um equino que morreu com sinais neurológicos no País.

*Bolsista DTI-1 do Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008, projeto 578385/2008-2.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

²Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Investigation of neurological diseases in equine tested negative for rabies

Investigação de doenças neurológicas em equinos testados negativos para raiva

Cunha, E.M.S.¹; Lara, M.C.C.S.H.¹; Villalobos, E.M.C.¹; Nassar, A.F.C.¹; Del Fava, C.¹; Scannapieco, E.M.^{1*}; Cunha, M.S.¹; Mori, E.²; Gomes, M.N.³

There are several central nervous system (CNS) diseases that can infect horses, and the differential diagnoses are therefore necessary. Clinically these diagnoses are often difficult once the degrees of ataxia and paresis are similar. The most commonly encountered abnormalities that may result in neurological dysfunction include trauma, equine herpesvirus, Eastern, Western and Venezuelan equine encephalomyelitis (EEE, WEE, VEE), leukoencephalomalacia, protozoan myeloencephalitis and bacterial encephalitis. The aim of this work was to identify the main diseases with neurological signs in equine after negative diagnosis for rabies. From April 2007 to June 2011, 167 samples of CNS

from animals that have died with neurological signs were submitted for rabies diagnosis by FAT (fluorescent antibody test) and MIT (mouse inoculation test). Those tested negative were further submitted to other analysis. Samples of the CNS were inoculated in cell culture and submitted to PCR for detection of herpesvirus and equine encephalomyelitis. In order to investigate the growth of bacteria, isolation in 5% blood agar and biochemical identification was performed. For the histological examination, CNS tissue samples were placed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin eosin. Our data confirmed rabies in 23 (13,8%) cases. Of 144 samples tested negative for rabies, 10 (7,0%) were positive for leukoencephalomalacia, 4 (2,8%) for herpetic myeloencephalitis and 12 (8,3%) for bacterial encephalitis. This study highlights the importance of including different diagnosis in samples from equine with neurological disease.

Financial support: CNPq/Mapa.

*Bolsista CNPq/MAPA.

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: cunha@biologico.sp.gov.br

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da São Paulo, SP, Brasil.

³Defesa Animal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Caracterização molecular do genoma de cepas do vírus da raiva correlacionadas à imunopatologia e desenvolvimento de RT-PCR em tempo real

Molecular Characterization of rabies virus strains correlated with immunopathology and the development of a real-time RT-PCR

Casseb, L.M.N.¹; Barbosa, T.F.S.¹; Travassos da Rosa, E.S.¹; Pereira, A.S.¹; Nunes, M.R.T.¹; Medeiros, D.B.A.¹; Quaresma, J.A.S.²; Fernandes, E.R.³; Duarte, M.I.S.³; Vasconcelos, P.F.C.¹

O projeto visa a caracterizar molecularmente o genoma de cepas de raiva (variantes antigênicas 2 e 3) e sua associação com a patogenia, bem como realizar a quantificação do RNA viral por RT-PCR em tempo real. Foram realizados os procedimentos de infecção experimental em camundongos albinos suíços com idade de 21 dias com duas cepas em diferentes vias de administração. Os animais foram observados diariamente e as coletas iniciaram-se a partir do 5º dia pós-inoculação. Foram obtidas sequências nucleotídicas do genoma completo do VRab em sequenciador 454 e também foram obtidos amplicons de 490 pb determinados entre as posições 868 e 1359 da nucleoproteína pelo método de Sanger. Os produtos obtidos pelo método de pirosequenciamento estão sendo montados para análise filogenética e genômica. Observou-se que os animais infectados pela via intracerebral foram a óbito até o 15º dia PI, e alguns animais infectados pelas vias musculares permanecem em observação sem apresentar sinais de doença, mesmo após 90 dias. Das amostras coletadas dos animais, parte está armazenada em freezer a -70º C para estudos posteriores e parte foi fixada em formol e está sendo incluída em parafina para proceder aos estudos histológicos e de imunohistoquímica. O estudo desenvolvido até o momento permitiu as seguintes conclusões: foi possível obter produtos do genoma completo pelo método de pirosequenciamento das amostras em estudo, que estão em análise; os anticorpos para imunohistoquímica estão sendo adquiridos, bem como o treinamento de recursos humanos para realização das técnicas histológicas e de imunohistoquímica.

Apoio Financeiro: MCT/ CNPq/ Mapa / SDA n° 64/2008.

¹Instituto "Evandro Chagas", Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Rod. BR-316, km 7, CEP 67030-000, Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil.
E-mail: liviacasseb@gmail.com

²Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Laboratório de Imunohistoquímica, Belém, PA, Brasil.

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Laboratório de Patologia, São Paulo, SP, Brasil.

Producing farms of beef and dairy cattle in northern and northwestern of Rio de Janeiro State, Brazil: analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies and profile economic-sanitary*

Fazendas produtoras de bovino de corte e leite no norte e nordeste do Estado do Rio de Janeiro: análises da raiva transmitida aos bovinos por morcegos hematófagos e perfil econômico-sanitário

Florido, V.A.; Pereira, S.R.F.G.; Meireles, M.A.D.; Bernardo-Pedro, T.; Oliveira, A.C.; Linhares, J.M.; Galante, A.C.; Vieira, L.F.P.

Rabies is an infectious disease of viral origin and lethal course that affects domestic animals of economic interest (domestic herbivores). The main transmitter for domestic herbivores is the common vampire bat *Desmodus rotundus*. The objective of this work is to trace the profile economic-sanitary of the producing farms of beef and dairy cattle with rabies transmitted by *D. rotundus*. Survey of farms with rabies cases in Northern and Northwestern of Rio de Janeiro State was made from the data of the Centers for Agricultural Defense (NDA) in the study area, and questionnaires were delivered to farmers. Data were analyzed by drawing a profile of these farms according to their production type, size and breeding system, identifying the occurrence of rabies and the degree of knowledge of the farmers about the virosis at the following locations: Batatal, Boa Vista, Cardoso Moreira, Caxeta, Dores de Macabu, Espírito Santinho, Hatobá, Italiana, Itálva, Pedra Santa, Santa Maria, São Francisco de Itabapoana e Vila Nova. Mixed farming (37%), dairy farms (36%) and beef producing (27%) were typed. For size, 47% were small-scale farming (up to 100 animals), 18% of medium farms (100 to 300 animals) and 35% of large (over 300 animals). The farms had an extensive creation system, even with pasture rotational; 55% of extensive system, 27% of extensive system with pasture rotational, and 18% of pasture rotational. The presence of the vampire bat bite was reported in animals (75%); most farmers showed that knowing the dangers that the vampire bat-transmitted cattle rabies can bring, but often there was negligence on their farms. The "vampiricid topic" and the contact with NDA were the main control measures; 20% of the farmers were applying the "vampiricid topic" on animals attacked, 30% applying the "vampiricid topic" and sought NDA, and 50% sought NDA. All farms had more suspected cases of cattle rabies than confirmed laboratory; 20% of the farmers reported suspected cases in their properties and of these, 50% did not have sent samples for laboratory examination. Regarding the rabies vaccination, most farmers vaccinate their cattle (80%), however in a mistaken way; 75% made in the wrong period, 80% made not strengthening the first dose, and 20% have never used rabies vaccine. The results show that, as in most of Brazil, in Northern and Northwestern of Rio de Janeiro there are underreported cattle rabies cases. Through a greater number of data and a focused effort to cattle farmers, more information on prevention and control of rabies can be transmitted.

*CNPq/Mapa/SDA auxílio financeiro edital nº 064/2008. CNPq Bolsas. Proex-UENF Bolsas. Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia

e Viroses, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

E-mail: vanessa_florido@hotmail.com

Phylogeographic analysis of rabies virus from domestic herbivores and vampire bats in the Rio de Janeiro State, Brazil, between the years 2001 and 2006*

Análise filogeográfica de vírus rábico isolado de herbívoros domésticos e de morcegos hematófagos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre os anos de 2001 e 2006

Pereira, S.R.F.G.¹; Chicarino, C.N.¹; Vieira, L.F.P.¹; Castilho, J.G.²; Bernardo-Pedro, T.¹; Kotait, I.²; Câmara, F.P.³

Rabies is an enzootic disease in Brazil, including Rio de Janeiro state, especially rabies transmitted by vampire bats. All years are accounted large losses of livestock due to this disease in the State. The aim of this study was perform a phylogeographic analysis of rabies virus in the Rio de Janeiro state. It was analyzed a dataset of 58 genetic sequences from the coding region of the N gene. We isolated 35 samples in the Rio de Janeiro between 2001 and 2006 from vampire bats and domestic herbivores in 18 cities of the State. It was retrieved from GenBank 15 and 8 sequences from São Paulo and Minas Gerais states, respectively. With the Beast v1.6 software package, the group of sequences was analyzed by Bayesian Markov chain Monte Carlo method with the nucleotide substitution model K3Puf + G, strict molecular clock and an exponential growth tree prior. The reconstruction of the spatial-temporal dispersion of the samples, with viewing on Google Earth software, was performed by continuous phylogeographic analysis using relaxed random walks (RRW). The tree topology showed at least four main clusters of rabies virus in the Rio de Janeiro state. In a region of the state can exist, concomitantly, more than one virus lineage. In the South region circulate two lineages, three in the Centre, two in the Metropolitan and only one in the Northern region of the Rio de Janeiro state. It can be noticed among the main clusters the formation of sub-clusters, which consist of samples of nearby cities. Only a single sample from Itaboraí (metropolitan region) is included in a cluster with samples from the south of state. The space-time analysis showed the rapid movement of this sample, leaving the South toward the metropolitan region. Probably, this bovine was transported during the incubation period of the disease. In the Rio de Janeiro city was isolated a sample that has no close relationship with any other sequence analyzed. Probably the horse also was introduced in the Rio de Janeiro state during the incubation period of the disease. The movement of the virus among the States showed a spread of the virus from the Rio de Janeiro state towards the Minas Gerais and São Paulo states. In this case, the samples were genetically closer to those of municipalities near the border between the States. The results show an intense movement of rabies across the Rio de Janeiro state. These data can assist in disease control measures in the State.

*CNPq/Mapa/SDA Auxílio Financeiro Edital Nº 064/2008. CNPq Bolsa.

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Virologia e Viroses, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

E-mail: silvia.goncalves@pq.cnpq.br

²Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil. ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Microbiologia Professor "Paulo de Góes", Setor de Epidemiologia de Doenças Infecciosas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Inativação do *Mycobacterium Bovis* (espoligotipo sb1141) em creme de leite submetido a alguns parâmetros comerciais de pasteurização

Mycobacterium bovis (spoligotypesb1141) inactivation in whipping cream submitted to commercial pasteurization parameters

Rodrigues, L. A.¹; Ferreira Neto, J.S.¹; Ferreira, F.¹; Amaku, M.¹; Dias, R. A.¹; Gonçalves, V. S. P.²; Souza, G. O.¹; Telles, E. O.¹

A resistência térmica dos microorganismos é influenciada pelas características do agente, do substrato e do teor de gordura, dentre outros fatores. Embora a pasteurização do creme de leite tenha como objetivo a eliminação de microrganismos patogênicos eventualmente presentes no leite, além de reduzir os deteriorantes, não há parâmetro legal de tempo e temperatura de processamento desse produto. O *Mycobacterium bovis* é considerado um dos patógenos não formadores de esporo de maior resistência térmica que pode normalmente ser transmitido pelo leite. Em decorrência das atividades do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina, têm-se vários isolados autóctones dessa espécie. Assim, este trabalho se propõe a avaliar a inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1141 isolado de bovino abatido no Estado de São Paulo) em creme de leite fresco submetido a alguns parâmetros comerciais de pasteurização. Creme de leite pasteurizado foi obtido no mercado, contaminado e submetido ao tratamento térmico em banho-maria a 75° C, 80° C, 85° C e 90° C, por 5 e 15 segundos. O agente foi quantificado por semeadura das diversas diluições, em duplicata, em meio Stonebrink com incubação a 36°C/45 dias. A redução na população variou de 3,9 log UFC/mL até a 6,8 log UFC/mL o que mostra que, nas condições do estudo, todos os binômios estudados mostraram-se capazes de reduzir a carga contaminante para níveis tão baixos ou menores que 0,1 log UFC/mL, considerando a máxima contaminação inicial natural do leite por *M. bovis* (4 log UFC/mL), citada por Ball (1943).

Financiamento: CNPq/Mapa edital 64 e Fapesp (auxílio nº 2007/07595-9).

¹Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: bufalo@usp.br

²Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, Brasil.

Protocolo para estudos de sobrevivência do *Mycobacterium Bovis* em queijo parmesão

Protocol for study of *Mycobacterium bovis* surviving in parmesan cheese

Starikoff, K. R.^{1*}; Ferreira Neto, J. S.¹; Ferreira, F.¹; Amaku, M.¹; Dias, R. A.¹; Gonçalves, V. S. P.²; Souza, G. O.¹; Telles, E. O.¹

A legislação brasileira exige o uso de leite pasteurizado na fabricação de queijos, exceto se o produto tiver um período de cura superior a 60 dias. Porém, não há comprovação científica sólida de que o processo de maturação de queijos, por si só, seja suficiente para inviabilizar os patógenos eventualmente presentes no leite cru. Assim, este projeto se propôs a estabelecer um protocolo de estudo sobre o efeito do processo de cura na viabilidade do *Mycobacterium bovis* em queijo, que poderá ser utilizado para estudar o processo de cura de diferentes queijos sobre os diversos isolados autóctones que circulam no País, inclusive

outros patógenos. A escolha desse queijo para o estudo se deve ao fato de que, apesar de ser um queijo de cura longa (portanto pode ser fabricado com leite cru), observa-se no mercado a existência de produtos que apresentam características de cura curta, como a casca fina e massa macia, provenientes de empresas pequenas que dificilmente teriam condições de manter a produção de 60 dias em câmara de cura antes de colocar o produto no mercado. Dois queijos foram fabricados com leite experimentalmente contaminado com o espoligo tipo 1033 do *M. bovis* (6,0 log UFC/mL) e os queijos foram analisados semanalmente durante a cura a 18° C (dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63). As amostras foram submetidas à diluição decimal e seriada e semeadas em garrafas de cultivo celular contendo meio Stonebrink-Leslie adicionado de antibiótico e incubados a 36° C/45 dias. Os resultados mostraram uma redução média de 1,4 log UFC/g durante os 63 dias de cura (média foi de 5,5 log UFC/g no dia 1 e 4,1 log UFC/g no dia 63). Um terceiro queijo foi fabricado, mas os resultados foram perdidos porque houve grande crescimento de fungos no queijo, o que inviabilizou a análise, devido à deterioração do meio de cultura durante o período de incubação. Estão sendo realizados estudos com esses fungos, de forma a se conseguir alterar a fórmula do meio e reduzir a ocorrência dos danos causados por eles.

Financiamento: CNPq/Mapa edital 64

*Bolsista: Capes – cota de curso.

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: bufalo@usp.br

²Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, Brasil.

Desenvolvimento e validação de um novo método para produção de maleína para diagnóstico de mormo

Development and validation of a new method for production of malein for the diagnosis of glanders

Reis, J.K.P.¹; Leite, R.C.¹; Carvalho Filho, M.B.²; Ramos, R.M.²; Machado, E.R.³

O mormo é uma doença de potencial zoonótico que acomete primariamente os equídeos. O agente causal do mormo é a bactéria *Burkholderia mallei*, um bastonete pequeno, gram-negativo, imóvel, intracelular facultativo. No Brasil, as normas para controle e erradicação do mormo preconizam o uso dos métodos de diagnóstico de fixação de complemento e o teste imunológico da maleína. A maleína atualmente utilizada no Brasil é importada e produzida com cepas exóticas de *B. mallei* a partir de uma adaptação da técnica utilizada para produção de tuberculina, resultando em um produto primariamente proteico, mas ainda pouco purificado. No projeto em tela, com o objetivo de aumentar a qualidade do reagente e a especificidade do teste, foi efetuada a purificação parcial de quatro lotes de maleína produzidos com cepas autógenas de *B. mallei*. A purificação do reagente visou a separação das frações proteicas de peso molecular acima de 350.000 Da, consideradas mais imunorreativas. Foi utilizado um concentrado proteico produzido pela precipitação do sobrenadante de culturas de *B. mallei* pela adição de ácido tricloroacético. O antígeno foi purificado em um sistema de filtração tangencial equipado com uma membrana de celulose regenerada com ponto de corte de 300.000 Da. A fração purificada foi caracterizada por SDS-PAGE e HPLC e apresentou possuir peso molecular na faixa de 660.000 Da. As maleínas experimentais tiveram sua potência testada frente a um padrão internacional pela inoculação de

equinos sensibilizados. A especificidade dos antígenos foi avaliada pela comparação das reações produzidas nos animais sensibilizados e nos controles negativos. As reações foram medidas pela diferença das leituras da dobra da pele, em milímetros, em cada ponto de inoculação, antes e 48 horas após a inoculação. As médias das reações produzidas pelas maleínas experimentais e pela maleína-padrão nos animais sensibilizados foram 6,82 mm e 3,15 mm, respectivamente. No grupo controle, a média das reações produzidas pelas maleínas experimentais foi 1,80 mm. O tratamento estatístico dos dados obtidos dos testes de potência e especificidade revelou que as maleínas experimentais são mais potentes que a maleína-padrão e não produzem reações inespecíficas.

Auxílio financeiro: SDA/Mapa/CNPq (Edital nº 64/2008).

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Retrovírus, Av. Antonio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: jenner@ufmg.br

²Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

³Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Utilização de inteligência artificial (redes neurais de inteligência artificial) para a classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia Coli* isoladas de frangos de corte

Use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the pathogenicity of Escherichia coli isolates from broilers

Salle, C.T.P.¹; Rocha, A.C.G.P.²; Souza, G.F.³; Salle, F.O.^{1*}; Moraes, L.B.^{1**}; Nascimento, V.P.¹; Moraes, H.L.S.¹

Os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade das *E. coli* e cada vez mais é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Entretanto, a diferenciação de cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. Neste trabalho, são apresentadas três redes neurais de inteligência artificial que foram desenvolvidas por análise dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), motilidade e do índice de patogenicidade (IP) para a predição ou classificação de patogenicidade de cepas de *E. coli* sem a necessidade da utilização de animais. Na Rede 1, utilizando 11 categorias de IP houve 54,27% de acerto. No intuito de melhorar o desempenho do modelo, foi criada uma segunda rede, utilizando três categorias de IP com classificação correta de 80,55%. Na tentativa de melhorar ainda mais seu desempenho, passou-se a trabalhar com apenas duas categorias, construindo, dessa forma, a Rede 3. Com essa nova configuração a classificação correta foi de 83,96%. As características do modelo permitem a classificação da patogenicidade das amostras isoladas nos galpões com bom grau de confiabilidade, levadas em conta a sensibilidade e a especificidade. Com esta metodologia a patogenicidade da amostra é conhecida sem a necessidade da inoculação de animais.

*Bolsista de Pós-Doutorado, PPG-Cirurgia.

**Bolsista CNPq, DTI 1.

Apoio Financeiro: Mapa/CNPq.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia, Av. Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: ctps@ufrgs.br

²Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Coordenação Geral de Laboratório, Brasília, DF, Brasil.

³Diplomata Alimentos, Concórdia, SC, Brasil. Porto Alegre, RS, Brasil.

Técnicas de identificação do Circovírus tipo 2 em suínos provenientes de granjas e matadouros do Estado de São Paulo, Brasil

Techniques for the identification of Circovirus type 2 in swine from pig farms and slaughterhouse of the state of São Paulo, Brazil

Martins, A.M.C.R.P.F.; Catroxo, M.H.B.; Bersano, J.G.; Ogata, R.

O Circovírus Suíno tipo-2 é o agente etiológico da síndrome multissistêmica do definhamento do leitão desmamado (SMDLD) ou da síndrome multissistêmica caquetizante pós-desmame. Tem sido relatado em vários países, associado ou não a achados patológicos. É uma doença emergente, que pode tornar-se um fator limitante para o desenvolvimento da suinocultura mundial, com mortalidade variando de 3% a 10%, podendo atingir 35%. O PCV-2 foi descrito, pela primeira vez, no Canadá em 1991, associado à síndrome de refugagem multissistêmica dos suínos, em animais sem sinais clínicos de enfermidade e em animais com síndrome de dermatite e nefropatia suína, distúrbios reprodutivos, síndrome do complexo respiratório suíno, pneumonia proliferativa e necrosante e tremor congênito. É um DNA vírus fita simples, não envelopado, com simetria icosaédrica, medindo de 15 a 17 nm de diâmetro e tendo a sua replicação favorecida por inibir a produção de interferon. Objetivando a detecção do PCV-2, em amostras teciduais, foram utilizadas as técnicas histopatológica, de contração negativa, de imunohistoquímica, de imunocitoquímica eletrônica (imunomarcagem com partículas de ouro coloidal em contração negativa), contribuindo para posteriores exames de rotina dessas viroses nos suínos e, portanto, colaborando com o agronegócio suínico nacional. Foram examinados 65 animais provenientes de várias cidades do Estado de São Paulo (Ibiúna, Jacarei, Pedra Bela, Franco da Rocha, Boituva, Descalvado, Embu-Guaçu e São José dos Campos). As lesões histológicas localizaram-se de forma regular nos tecidos linfoides (depleção linfocitária) (linfonodos, baço, tonsila, placas de Peyer) e pulmão, e de forma menos frequente no rim, fígado e outros tecidos. O achado relevante para o diagnóstico é a presença de células multinucleadas e inclusões basofílicas intracitoplasmáticas principalmente nos histiócitos, as quais são patognomônicas da doença. Cortes de tecidos positivos ou suspeitos pela histopatologia foram submetidos à imunohistoquímica, usando o anticorpo monoclonal. A reação antígenoanticorpo foi corada em marrom pelo DAB e visualizada em 12 animais dos 65 (18,46%) examinados. Em todos os órgãos, as células positivas foram encontradas nos infiltrados inflamatórios. Esses resultados foram confirmados pela técnica de contração negativa (preparação rápida) e de imunocitoquímica com marcação com ouro coloidal para microscopia eletrônica de transmissão, sendo visualizadas partículas de circovírus, não envelopadas, esféricas e isométricas, caracterizadas como partículas completas e vazias, medindo de 17 a 20 nm de diâmetro. A reação antígeno-anticorpo foi realizada pelas partículas de ouro coloidal. O exame coproparasitológico das fezes e alças intestinais apresentou resultados negativos. A IHQ e a imunocitoquímica foram muito sensíveis para detectar PCV-2. Como os animais eram portadores aparentemente são, fica um alerta sobre essa patologia emergente e limitante do desenvolvimento dos suínos.

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: crisfm@biologico.sp.gov.br

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* pela técnica de multiplex-PCR

Investigation of genes related with virulence in samples of *Pasteurella multocida* through the multiplex-PCR protocols

Furian, T. Q.; Borges, k. A.; Rocha, S. L. S.; Salle, C. T. P.; Moraes, H. L. S.

Os atuais sistemas de criação na avicultura baseados na alta densidade populacional aumentam os riscos de disseminação de enfermidades, especialmente das doenças respiratórias e daquelas cujos agentes etiológicos possuem mais de um hospedeiro. A cólera aviária (CA) possui essas características e geralmente apresenta-se de forma aguda e com altos índices de morbidade e de mortalidade. Apesar de representar uma das patologias aviárias que deve ser considerada para o diagnóstico diferencial de enfermidades com notificação obrigatória que cursam com morte súbita, a patogenia e os fatores de virulência envolvidos na CA ainda estão pouco elucidados. O objetivo deste trabalho foi pesquisar 15 genes associados à virulência em 25 amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de CA na região sul do Brasil, com o emprego protocolos de multiplex-PCR. Além disso, o presente estudo visou a comparar a capacidade de tipificação capsular do método molecular com testes fenotípicos. Os protocolos de multiplex-PCR empregados foram capazes de detectar todos os genes propostos. Os genes ompH, oma87, sodC, hgbA, hgbB, exBD-tonB, nanB, hyaD-hyaC estiveram presentes em 100% das amostras (25/25). Os genes sodA e nanH em 96% (24/25), o gene ptfA em 92% (23/25) e o gene pfhA em 60% (15/25). Os genes toxA, bcbD, dcbF não foram identificados em nenhuma das amostras pesquisadas (0/25). A tipificação capsular pelo teste molecular apresentou maior capacidade de detecção quando comparada aos testes fenotípicos, pois enquanto 36% (9/25) das amostras não foram identificadas pelo teste convencional, apenas 8% (1/25) não foram tipificadas através pelo multiplex-PCR. Foram obtidos seis diferentes perfis genéticos, sendo P1 (negativo para os genes toxA, dcbF e bcbD) o mais comum. Com este trabalho, concluiu-se que os protocolos de multiplex-PCR empregados são uma ferramenta bastante útil e rápida para a detecção simultânea dos genes de virulência. Apesar da alta frequência dos genes estudados e de todas as amostras pertencerem à mesma subespécie de *P. multocida*, foram observados seis perfis genéticos, os quais devem ser confirmados em um estudo com um maior número de amostras.

Apoio financeiro: Mapa/CNPq.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Av. Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.
E-mail: ctps@ufrgs.br

Resíduos antimicrobianos no leite de cabra produzido no Estado da Paraíba

Antimicrobial residues in goat milk produced in Paraíba state

Nardelli, M. J.^{1*}; Carvalho, M. G. X.¹; Nogueira, F. R. B.²; Silva, G. B.^{1*}; Silva, A. C.^{1*}; Ribeiro, M. S. S.¹; Gomes, I. S.¹; Silva, I. B.¹

O leite de cabra é uma importante fonte proteica com características de fácil digestibilidade e hipoalergenidade. A Paraíba possui elevada produção desse leite, voltada para venda ao programa governamental “Fome Zero” e à distribuição às famílias de baixa renda. O aproveitamento de seus nutrientes é eficiente se ele estiver livre de contaminantes, tais como resíduos antimicrobianos, que representam risco à saúde da população, além de provocarem prejuízos nas indústrias de processamento. O consumo de leite com esses resíduos pode ocasionar problemas digestivos e quadros alérgicos em indivíduos sensíveis. Além disso, a ingestão de pequenas concentrações favorece o estabelecimento de resistência bacteriana. Portanto, este trabalho teve como objetivo pesquisar a presença de resíduos antimicrobianos no leite de cabra *in natura*, refrigerado e pasteurizado, produzido em municípios paraibanos. As amostras foram coletadas em dois períodos do ano (chuvoso e seco) nas plataformas de recebimento de postos de resfriamento e miniusinas em 11 municípios da região do Sertão e 18 da Borborema. As amostras foram colocadas em frascos de 500 mL, identificadas com o nome dos produtores e mantidas sob refrigeração até o momento das análises, realizadas nos laboratórios da UFCG e das miniusinas. As amostras foram homogeneizadas, retirando-se uma alíquota de 10 mL em tubos de ensaio, passando por um pré-aquecimento (80° C/5min) para destruir as enzimas com atuação antimicrobianas. Em seguida, foi aplicado o teste microbiológico de triagem Deltovest SP, seguindo metodologia recomendada pelo fabricante. Das 1.148 amostras analisadas de leite de cabra *in natura*, foram encontradas 36 (3,13%) positivas e 14 (1,21%) no limite de detecção para resíduos antimicrobianos. Nas 28 refrigeradas, foram observadas duas (7,14%) positivas e nas 20 amostras pasteurizadas, todas foram negativas. A região do Sertão, apesar de possuir menor número de amostras de leite de cabra *in natura*, das 139 amostras examinadas, teve 17 (12,23%) positivas e 12 (8,63%) estavam no limite de detecção. Em relação à Borborema, com 1009 amostras coletadas, foram observadas para o leite *in natura* 19 (1,88%) positivas e duas (0,19%) no limite, além das 27 de leite de tanques de resfriamento, que apresentaram duas (7,40%) positivas. Quando estudada a distribuição da presença dos resíduos em relação à sazonalidade, observou-se que nas duas regiões o período chuvoso apresentou maior número de amostras positivas (26) e 12 no limite de detecção, em relação ao período seco, com dez positivas e duas no limite. No teste de triagem para monitoramento da presença de resíduos antimicrobianos, foram identificadas amostras positivas no leite de cabra *in natura* em tanques de resfriamento.

*Bolsistas do CNPq/Mapa.

¹Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, CP 64, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil.

E-mail: juvetnardelli@yahoo.com.br

²Instituto Federal da Paraíba, Sousa, PB, Brasil.

Presença de resíduos antimicrobianos após o período de carência em leite de cabras com mastite

Presence of antimicrobial residues after waiting period in milk of goats with mastitis

Silva, G. B.^{1*}; Nardelli, M. J.^{1*}; Carvalho, M. G. X.¹; Nogueira, F. R. B.²; Medeiros, N. G. A.¹; Silva, L. B.¹; Silva, A. C.^{1*}; Ribeiro, M. S. S.¹; Gomes, I. S.¹

A mastite é um entrave na cadeia produtiva leiteira, reduzindo a produção e comprometendo a composição do leite. Nos rebanhos caprinos leiteiros, é frequente o emprego de antimicrobianos no tratamento dessa enfermidade e isso ocasiona a presença de resíduos no leite de consumo. A presença desses resíduos representa um problema de saúde pública, podendo causar reações alérgicas e seleção de bactérias resistentes. Esta pesquisa teve como objetivos o estudo da presença de persistência na eliminação de resíduos antimicrobianos no leite de cabras lactantes após o período de carência, a verificação da ocorrência de mastite em um rebanho e a identificação dos agentes etiológicos da enfermidade, bem como sua sensibilidade dos mesmos aos antimicrobianos. Para isso, foram coletadas amostras de 67 animais de um rebanho localizado no município de Emas, PB, no período de novembro de 2010 a janeiro de 2011, sendo realizados os testes de Tamis, California Mastitis Test (CMT), contagem de células somáticas (CCS), cultivo e isolamento bacteriano e antibiograma. Foram selecionados 11 animais com agentes infecciosos e esses foram tratados com gentamicina (intramamário) e oxitetraciclina (injetável). Após o período de carência recomendado pelo fabricante (96h), pesquisou-se a presença de resíduos por meio do teste de triagem Delvotest SP, encontrando-se como resultados positivos por animal: Tamis 10,44%, CMT 52,23%, CCS 44,77% e cultivo microbiológico 16,41%, sendo os agentes isolados *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. os que apresentaram resistência à penicilina, ampicilina, cloranfenicol e oxacilina. Tanto o tratamento intramamário como o intramuscular apresentaram persistência de resíduos, 33,33% e 20% respectivamente, por 144h. Além disso, 33,33% dos animais tratados com gentamicina e 20% com oxitetraciclina apresentaram crescimento bacteriano após o tratamento. Ao final da pesquisa, concluiu-se que o rebanho estudado apresentava mastite clínica e subclínica provocada por dois agentes, com resistência aos antimicrobianos. Os animais foram tratados foi constatada a persistência de resíduos dos medicamentos utilizados após o período de carência recomendado pelo fabricante.

*Bolsistas do CNPq/Mapa.

¹Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, CP 64, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil.

E-mail: juvetnardelli@yahoo.com.br

²Instituto Federal da Paraíba, Sousa, PB, Brasil.

Mastite caprina causada por *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. resistentes a antimicrobianos

Caprine mastitis caused by Staphylococcus sp. and Corynebacterium sp. resistant to antimicrobial

Nardelli, M.J.^{1*}; Carvalho, M.G.X.¹; Garino Júnior, F.¹; Silva, L.C.A.²; Matos, R.A.T.²; Medeiros, N.G.A.¹; Silva, G.B.^{1*}; Silva, A.C.^{1*}; Ribeiro, M.S.S.¹

Nos caprinos leiteiros, a principal enfermidade infecciosa que acomete esses animais é a mastite causada principalmente por bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. A utilização de terapias sem critério técnico têm favorecido o surgimento de resistência desses agentes aos antimicrobianos existentes no mercado, representando um fator de risco para a saúde pública, ao favorecer a seleção de cepas com alta patogenicidade e produtoras de toxinas, que poderão causar infecções graves no organismo humano. Esta pesquisa teve como objetivos estudar a presença de mastite clínica e subclínica em rebanhos leiteiros, identificar os agentes envolvidos e verificar a resistência dos mesmos

a antimicrobianos comercializados na Paraíba. Para isso, foram examinadas 139 cabras em lactação, provenientes de duas propriedades localizadas no sertão paraibano, utilizando os testes de Tamis, California Mastitis Test (CMT), cultivo, isolamento bacteriano e antibiograma. Foram selecionados os animais com agentes infecciosos e nesses foi aplicado o tratamento com quatro medicamentos seguindo protocolos distintos: gentamicina bisnaga, oxitetraciclina injetável, gentamicina intramuscular e intramamário, flumetasona, neomicina e espiramicina, em dez, 11, seis e dez animais, respectivamente. Os animais foram pesados, receberam o tratamento e seguiu-se o tempo de administração indicado pelos fabricantes. Decorridos cinco e dez dias do tratamento, foram repetidos os exames microbiológicos. Observou-se um percentual de mastite clínica de 10,79% e subclínica de 67,62% no CMT, sendo que 37 (26,6%) animais apresentaram infecção por *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp., com percentual de 91,90 e 8,10 respectivamente. No antibiograma, os agentes detectados mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos utilizados nos tratamentos, porém 24,32% apresentaram-se resistentes, com persistência do agente causador da enfermidade. A oxitetraciclina apresentou maior percentual, em que 36,36% dos animais tratados continuaram apresentando o agente e 6,89% reinfetaram-se após o término do tratamento. Os rebanhos estudados apresentaram mastite clínica e subclínica, provocadas por bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp., as quais apresentaram resistência a antimicrobianos utilizados corriqueiramente nas propriedades.

*Bolsistas do CNPq/Mapa.

¹Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, CP 64, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil.

E-mail: juvetnardelli@yahoo.com.br

²Instituto Federal da Paraíba, Sousa, PB, Brasil.

Contribuição do laboratório de sanidade animal (Ladesa) para a defesa agropecuária baiana, Brasil

Contribution from the Laboratório de Sanidade Animal (Ladesa) to the agricultural defense of Bahia state, Brazil

Ribas, J. R. L.¹; Guimarães, S. A. F.^{2,4}; Almeida, A. V. A. F.^{2,4}; Macedo, A. C. C.^{2,4}; Duarte, L. F. C.^{2,4}; Santos, S. L.^{2,4}; Santana, P. C.^{2,4}; Rosa, M. R. G.^{3,4}; Rodrigues, f. M.⁴

A implementação do Centro Laboratorial de Apoio à Defesa Agropecuária foi concretizada no ano de 2009, com a aprovação de um projeto pelo edital 64/2008 CNPq/Mapa/SDA, processo nº 578512/2008-4, que teve como objetivo incrementar os diagnósticos laboratoriais nas áreas de sanidade animal e vegetal. O Laboratório de Sanidade Animal (Ladesa) foi implantado por um convênio assinado entre a Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) e a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A. (EBDA), com a finalidade de identificar, desenvolver e adequar os principais métodos de diagnóstico na área animal, contemplando as principais enfermidades de interesse para a defesa sanitária animal nas áreas de bacteriologia, parasitologia e virologia. É importante salientar que até o ano de 2008 o único diagnóstico realizado no laboratório era o da anemia infecciosa equina (AIE). Dessa forma, salienta-se a grande evolução das ações até então desenvolvidas, com a expansão para outras enfermidades, tanto no que se refere ao desenvolvimento de ações laboratoriais de apoio a diagnóstico de enfermidades que ocorrem nas diversas regiões do Estado, bem como já desponta a realização de ações de

pesquisa, a exemplo da detecção de *Salmonella* sp. em frangos abatidos sob o serviço de inspeção estadual, análise microbiológica do leite, levantamento da leucose bovina, entre outros, além da contribuição na formação de profissionais para atuar na referida área com a capacitação de acadêmicos, estudantes universitários, disponibilização de estágios curriculares e de bolsas para estudantes e veterinários com a intervenção da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb). Entre os anos de 2009 e 2011 foram analisadas ou triadas para envio a laboratórios da rede oficial (Lanagros, IMA/MG e Lacen/BA) o seguinte número de amostras: AIE (13.987), artrite encefalite caprina - CAE (1.371), Brucelose ovina (1.036), pleuropneumonia ovina - maedi-visna (81), LEB (439), salmonelose aviária (485), babesiose equina (39), raiva (312), encefalite espongiiforme bovina - EEB (57), influenza aviária (4.187), enfermidade vesicular (191), enteroparasitoses de animais de produção (104), ectima contagioso (2), dentre outros. Em 2010, visando a avaliar a ausência de circulação viral e avaliação da cobertura vacinal contra a febre aftosa em zona livre e de proteção, o laboratório aliquotou e enviou ao Lanagro/PA amostras de soro de 6.568 bovinos, contribuindo para o fortalecimento da agropecuária baiana e reconhecimento internacional da extinção da zona tampão do Estado da Bahia pela OIE e zona livre de febre aftosa com vacinação, contribuindo, efetivamente, para o desenvolvimento socioeconômico de toda a região. Ressalta-se, dessa forma, a efetiva contribuição que o referido projeto vem proporcionando ao segmento pecuário baiano, inclusive aglutinando esforços dos órgãos estaduais que atuam em prol da pecuária baiana.

¹Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 967, CEP 40170-110, Salvador, BA, Brasil.

E-mail: fredericomr@hotmail.com

²Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

³Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Salvador, BA, Brasil.

⁴Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador, BA, Brasil.

Determinação e quantificação de sulfonamidas em leite por cromatografia a líquido de rápida resolução acoplada à espectrometria de massas

Determination and quantification of sulfonamides in milk using rapid resolution liquid chromatography coupled to mass spectrometry

Lemos, M. A. T.; Ochs, S. M.; Matos, C. A.; Pereira Netto, A. D.

Agentes antimicrobianos são largamente utilizados no tratamento de doenças de animais que produzem alimentos para consumo humano. As sulfonamidas são empregadas como agentes antimicrobianos e antiparasitários no gado leiteiro. Porém, essas substâncias não podem estar presentes no leite de consumo, pois podem causar hipersensibilidade em indivíduos sensíveis e propiciar a seleção de cepas resistentes a essa classe de fármacos. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu um limite máximo permitido (LMR) de 100 µg kg⁻¹ desses fármacos no leite. O objetivo do presente trabalho foi implementar condições de quantificação de sulfonamidas em leite UHT integral de diferentes marcas adquiridas no comércio da cidade de Niterói, RJ, Brasil. A extração das fortificações de 25 e 50 µg L⁻¹ foi avaliada em triplicata. Amostras de leite de 1 mL receberam adição de 250 e 125 µL da mistura de sulfas estudadas na concentração de 200 µg L⁻¹ em metanol e adição de 100 µL de padrão interno (*sulfameter* – 1.000 µg L⁻¹) e foram mantidas em repouso por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 350 µL de ácido trifluoroacético 80%

em metanol para promover desproteção. A solução obtida foi submetida à extração por ultrassom e centrifugada. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo. Ao *pellet*, foi adicionada solução 0,1 M de Na₂ EDTA pH 9 e o procedimento de extração foi repetido. O extrato do leite foi ajustado a pH 6 com hidróxido de sódio 1M e submetido a uma etapa de *clean-up* por extração em fase sólida com cartucho e eluição com 3 mL de metanol. O extrato resultante foi concentrado sob fluxo de nitrogênio a 40° C até o volume final de 1 mL. As sulfonamidas foram determinadas por cromatografia a líquido de rápida resolução com detecção por espectrometria de massas, utilizando-se interface de ionização química à pressão atmosférica, em modo positivo e monitoramento de reações múltiplas (MRM). Uma coluna (100 x 4,6 mm x 1,8 µm) e fase móvel composta por metanol e solução aquosa de ácido fórmico 0,05% foram empregadas. As recuperações nos dois níveis de fortificação variaram na faixa de 72 a 124% e de 75 a 103% respectivamente, com desvios-padrão relativos que variaram de 2 a 12%. Limites de quantificação de 2 a 5 µg L⁻¹ foram obtidos. De modo geral, os valores encontrados estão de acordo com os valores de LMR do Codex Alimentarius (10 µg kg⁻¹). Nas amostras de leite UHT Integral analisadas não foi detectada a presença de nenhuma das sulfonamidas estudadas.

CNPq/Mapa; Capes; PIBIC-CNPq.

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Outeiro de São João Batista, s/nº, CEP 24020-141, Niterói, R.J, Brasil.

E-mail: annibal@vm.uff.br

Produção e avaliação de vacina contra agalaxia contagiosa

Production and evaluation of vaccine against contagious agalactia

Campos, A. C.^{1*}; Silva, R. B. S.²; Cordeiro, A. A.^{2**}; Mamede, A. G.^{2**}; Alcantara, M. D. B.³; Melo, M. A.²; Castro, R. S.¹; Azevedo, E. O.²

O trabalho teve como objetivo produzir e avaliar a eficiência de três vacinas contra a agalaxia contagiosa, uma doença emergente em caprinos e ovinos do Nordeste brasileiro. Amostras de *Mycoplasma agalactiae* foram isoladas de animais naturalmente infectados, identificadas e caracterizadas por provas bioquímicas, reação em cadeia da polimerase, SDS-PAGE e western-blotting. Para avaliar a resposta sorológica, foi utilizado um ELISA indireto. As vacinas foram inativadas com formaldeído na concentração de 0,4% e adsorvidas com hidróxido de alumínio (vacina 1), montanide IMS 2215 PR VG (vacina 2) e montanide Gel 01 PR (vacina 3). Para o teste de eficiência, cada vacina foi administrada em um grupo de oito caprinos e oito ovinos, jovens e adultos, machos e fêmeas, previamente testados para agalaxia contagiosa. Um grupo de três animais por espécie foi utilizado como controle. Os animais foram imunizados com duas doses de 2 ml cada, via subcutânea, com intervalo de 21 dias. Três animais por grupo foram desafiados com 10⁷ ufc/ml de cultura de *M. agalactiae*, via oral, 65 dias após a segunda dose vacinal e acompanhados diariamente para verificação de sinais clínicos, durante 90 dias. Nas fêmeas em lactação, o inóculo também foi administrado via intramamária. Amostras de leite, suabe nasal e ocular para isolamento de *M. agalactiae* e soro sanguíneo para determinação dos títulos de anticorpos foram coletadas semanalmente. As amostras isoladas apresentaram similaridade no perfil proteico com bandas variando de 30 a 135 KDa no SDS-PAGE, sendo que a P48 apresentou maior reatividade no western-blotting. As três vacinas induziram produção de anticorpos satisfatórios, sendo mais elevados nos caprinos que nos ovinos. A vacina 2 induziu títulos mais elevados que as demais nas duas espécies. Após o desafio, nenhum sinal clínico compatível com agalaxia contagiosa foi observado

nos animais vacinados nas duas espécies. Uma cabra do grupo controle apresentou alterações macroscópicas do leite, com redução da produção, 28 dias pós-desafio. Foi possível o isolamento de *M. agalactiae* do leite desse animal. Os grupos controles permaneceram com níveis de anticorpos abaixo do ponto de corte durante todo o período anterior ao desafio. Conclui-se que as vacinas testadas induziram níveis de anticorpos significativos. Recomenda-se a inclusão dessa enfermidade no Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos - PNSCO, tendo como estratégia principal a vacinação dos rebanhos.

*Bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – Facepe, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.

**Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Projeto financiado pelo Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008.

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n°, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

E-mail: anabutron@gmail.com

²Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil. ³Médica veterinária da Emepa, João Pessoa, PB, Brasil.

Situação epidemiológica da brucelose no Brasil

Epidemiological situation of bovine brucellosis in Brazil

Ferreira Neto, J. S.¹; Gonçalves, V. S. P.²; Amaku, M.¹; Dias, R. A.¹; Telles, E. O.¹; Lobo, J. R.³; Figueiredo, V. C. F.³; Ferreira, F.¹

Dada a importância do PNCEBT para as cadeias produtivas de carne e de leite e a falta de adequada caracterização epidemiológica da brucelose e da tuberculose no rebanho bovino brasileiro, o presente estudo traz resultados sobre a situação da brucelose em 15 Unidades Federativas (UF) (RO, MT, GO, DF, TO, BA, SE, MS, MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS), que detêm 82% do efetivo bovino nacional. Essas UF foram divididas em regiões e em cada uma foram amostradas, aleatoriamente, de 150 a 300 propriedades. Nas propriedades com até 99 fêmeas (≥ 24 meses), dez animais foram amostradas aleatoriamente; naquelas com cem ou mais, 15. Desses animais, foi obtida uma amostra de soro para realização do teste AAT, seguido de reteste dos positivos pelos métodos 2ME ou FC. As prevalências de focos e de animais foram calculadas por região e também, de forma consolidada, por UF. O trabalho de campo foi realizado entre outubro de 2001 e dezembro de 2004, exceto para Mato Grosso do Sul, que utilizou dados de coleta de 1998. Os resultados mostraram grande heterogeneidade entre as UF e alguns Estados mostraram importantes diferenças de prevalência entre as suas regiões. Em ordem crescente, as prevalências de focos foram: de 0,33 (0,0 ≥ IC95% ≥ 1,0) em SC, 2,06 (1,5 ≥ IC95% ≥ 2,63) no RS, 2,52 (1,02 ≥ IC95% ≥ 5,12) no DF, 4,02 (3,23 ≥ IC95% ≥ 4,8) no PR, 4,2 (3,1 ≥ IC95% ≥ 5,3) na BA, 6,04 (4,98 ≥ IC95% ≥ 7,1) em MG, 9,0 (6,97 ≥ IC95% ≥ 11,55) no ES, 9,7 (7,8 ≥ IC95% ≥ 11,6) em SP, 12,6 (9,19 ≥ IC95% ≥ 16,01) em SE, 15,42 (12,91 ≥ IC95% ≥ 17,91) no RJ, 17,54 (14,91 ≥ IC95% ≥ 20,17) em GO, 21,22 (19,33 ≥ IC95% ≥ 23,11) em TO, 35,18 (32,09 ≥ IC95% ≥ 38,36) em RO, 41,2 (38,0 ≥ IC95% ≥ 44,4) no MT e 41,6 (37,0 ≥ IC95% ≥ 46,3) no MS. Dentre os Estados que apresentaram heterogeneidades entre regiões, destacaram-se Rio Grande do Sul, Paraná e Bahia. Todo o Estado de SC, o sul do PR e o norte do RS compõem uma grande área de prevalências muito baixas, onde a vacinação com a B19 não se faz necessária e onde poderia ser implementado um sistema de vigilância para detecção e saneamento dos focos residuais. Essa experiência serviria de exemplo para o restante do País. Em situação semelhante, encontram-se o Distrito Federal e a região central da

Bahia. Os demais Estados devem baixar a prevalência com a utilização da vacina B19, vacinando, no mínimo, 80% das bezerras nascidas. Além disso, a utilização da vacina RB51 em fêmeas adultas propiciaria a obtenção de boas coberturas vacinais mais rapidamente.

Financiamento: Mapa, Adapec, Adab, Agrodefesa, CDA, Cidasc, Deagro, Iagro, Idaron, IDAF, IMA, Indea, SAA, Seaapi, Seab, Seapa, CNPq (Edital 64, centro colaborador, processo 578214/01-3) e Fapesp (recursos humanos: 32 mestres e doutores já formados ou em formação).

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: jsoares@vps.fmvz.usp.br

²Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, Brasil.

³Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Saúde Animal, Brasília, DF, Brasil.

Desenvolvimento de um software para gestão das informações geradas pelo programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose (PNCEBT) no Estado do Rio Grande do Sul*

Development of software for managing data produced by the brucellosis and tuberculosis control and eradication national program (PNCEBT) in the state of Rio Grande do Sul

Corbellini, L. G.¹; Vasconcellos, P. A.^{1**}; Carvalho, J. B. P.²; Todeschini, B.³; Hein, H.¹; Nunes, L. N.²

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) em 2001, tem por objetivo específico a redução da prevalência e incidência da brucelose e tuberculose. O PNCEBT preconiza ações estratégicas de controle, como certificação voluntária de estabelecimentos de criação livres ou monitorados. Cabe ao médico veterinário habilitado (MVH) pelo Mapa a realização de testes diagnósticos e participação no processo de certificação. O processo de certificação de estabelecimentos livres, que inclui testes consecutivos dos animais do rebanho e daqueles que ingressem no estabelecimento, é complexo, gerando expressiva quantidade de dados. Um estudo com dados do PNCEBT do Estado do Rio Grande do Sul, RS, de 2008, analisou resultados de 63.226 testes individuais, evidenciando o volume de informações geradas pelo programa. Frente a esse cenário e à perspectiva da implantação de políticas de saneamento por áreas político-administrativas no RS, é imprescindível o desenvolvimento de sistemas de gestão integrada de dados como mecanismo facilitador do processo de decisão. O objetivo do projeto foi desenvolver um software para gerenciamento dos dados gerados pelos MVH. A base de dados do sistema foi desenvolvida em linguagem MySQL e a linguagem de programação do servidor foi desenvolvida em Rails. O sistema possui quatro interfaces, sendo três acessadas via web (nominadas: cadastro, web do veterinário e web do gestor) e uma acessada por um software cliente a ser instalado nos computadores dos MVH (nominado SIGEMV – Sistema Gerencial de Monitoria e Vigilância). O procedimento consiste da inserção no SIGEMV, pelo MVH, das informações da bateria de testes realizada, conforme aquelas definidas no atestado de realização de testes constante no Anexo III da Instrução Normativa nº 30/2006, além da declaração das doses utilizadas. Os dados são transmitidos ao servidor via internet. Pela web do veterinário, o MVH poderá emitir automaticamente atestados de realização de testes e relatório de utilização de antígenos.

Ademais, dados cadastrais de propriedades e animais não necessitarão de nova digitação quando da realização de novos testes, os quais são submetidos à análise de consistência intra e entreteste no momento de sua inserção. Os gestores do processo terão acesso às informações como quantitativo de propriedades em processo de certificação, número de focos e número de testes positivos, dentre outras, acessando a web do gestor. O sistema encontra-se em teste no município de Dois Irmãos, Estado do Rio Grande do Sul, desde janeiro de 2011. A desburocratização do processo obtida com a transmissão digital e armazenamento de dados em uma base integrada, análise dos dados em tempo real e transparência das informações são algumas das vantagens do sistema, que incrementarão a atratividade dos procedimentos de certificação voluntária preconizados pelo PNCEBT.

*CNPq/Mapa/SDA Nº. 064/2008.; **Bolsista DTI, Edital 64 do CNPq.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Av. Paulo Gama, 110, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: luis.corbellini@ufrgs.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Matemática, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Porto Alegre, RS, Brasil.

Teste de um software para gestão das informações geradas pelo programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose (PNCEBT) em situação real*

Field testing of software for managing data produced by the brucellosis and tuberculosis control and eradication national program (PNCEBT)

Corbellini, L. G.¹; Vasconcellos, P. A.^{1*}; Carvalho, J. B. P.³; Hein, H.¹; Groff, A. C.⁴; Almeida, J. R. M.⁵; Todeschini, B.⁵; Costa, A. A.⁶; Machado, G.¹; Brandão, F.O.¹

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) no ano de 2001, tem como objetivo reduzir a prevalência de brucelose e tuberculose e certificar um número elevado de estabelecimentos de criação. Desde 2008, a partir da ação pioneira nos municípios da Comarca de Arroio do Meio, o Estado do Rio Grande do Sul, RS, tem caminhado para adoção de ações de saneamento de brucelose e tuberculose dirigidas a áreas político-administrativas, com a adesão progressiva de municípios para certificação da totalidade de seus estabelecimentos de criação como livres e/ou monitorados. O processo de certificação em massa gerará uma demanda por gerenciamento de dados. Para obtenção de certificação de livre de tuberculose e brucelose, um estabelecimento de criação necessita de três baterias de testes negativas consecutivas, realizadas na totalidade de seus animais em intervalos de tempo definidos em legislação, os quais podem ser de até 360 dias, para o caso de todos os testes serem negativos. Durante todo o período de teste, há controle da movimentação e estoques animais. Todo esse processo necessita de ferramentas que otimizem sua gestão por parte de seus distintos participantes, objetivo preconizado pelo projeto de desenvolvimento de um software para gestão dos dados gerados pelo PNCEBT. O SIGEMV (Sistema Gerencial de Monitoria e Vigilância) é um aplicativo a ser instalado nos computadores do usuário final, nesse caso, médicos veterinários habilitados (MVH), com o objetivo de gerenciar e transferir os dados dos testes de certificação de estabelecimentos para o servidor que contém a base de dados. O município de Dois Irmãos, RS, iniciou, em janeiro de 2011, o

processo de certificação de todos os estabelecimentos de criação, atualmente em curso. Esse processo foi utilizado como cenário para teste de execução do sistema sob ponto de vista de seu usuário final, varrendo suas funcionalidades em busca de falhas e considerando as observações registradas pelos MVH. O teste do sistema permitiu a identificação de falhas, a adequação de funcionalidades de acordo com as demandas do processo de certificação e a identificação de cenários não previstos em testes de funcionalidade. Além disso, permitiu a avaliação e a aceitação dos usuários finais com relação ao software, principalmente com relação a sua usabilidade. Paralelamente, o teste do sistema está propiciando a rápida extração dos dados do servidor, permitindo, assim, tanto o acompanhamento da evolução do trabalho, como o teste da base de dados. De março a agosto de 2011, 134 estabelecimentos (74.8% do total) foram testados (992 e 1538 animais testados para brucelose e tuberculose, respectivamente), sendo confirmado um foco de tuberculose e um de brucelose.

*CNPq/Mapa/SDA Nº. 064/2008.

**Bolsista DTI, Edital 64 do CNPq.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Av. Paulo Gama, 110, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: luis.corbellini@ufrgs.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Matemática, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶Médico Veterinário autônomo, Município de Dois Irmãos, RS, Brasil.

Fatores de risco para brucelose bovina no Brasil*

Risk factors for bovine brucellosis in Brazil

Mota, A. L. A. A.¹; Gonçalves, V. S. P.¹; Ferreira, F.²; Lôbo, J. R.³; Amaku, M.²; Dias, R. A.²; Figueiredo, V. C. F.³; Telles, E. O.³; Ferreira Neto, J. S.²

A brucelose bovina é uma doença infecciosa causada pela *Brucella abortus* associada, principalmente, a problemas reprodutivos como abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade. Por causar grandes prejuízos econômicos ao setor pecuário, o Mapa, em colaboração com os serviços de defesa sanitária animal por unidade federativa e com o apoio da Universidade de São Paulo e da Universidade de Brasília, tem buscado conhecer melhor a situação epidemiológica da doença no País. Entre 2001 e 2004, foram realizados estudos de prevalência e fatores de risco da brucelose bovina em 14 unidades federativas (Bahia, Santa Catarina, Espírito Santo, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Sergipe e Tocantins) do Brasil, as quais foram subdivididas em 61 regiões pecuárias. Os resultados de prevalência já foram publicados e revelaram grande heterogeneidade da situação epidemiológica da brucelose bovina entre as diversas regiões estudadas. Nesta pesquisa, os dados dos 17.100 rebanhos amostrados nas 61 regiões foram submetidos à análise estatística. Após uma análise exploratória das variáveis por meio do teste do qui-quadrado, procedeu-se à regressão logística com todas aquelas que apresentaram um valor $p \leq 0,20$. O modelo logístico final revelou que as principais variáveis associadas à presença de brucelose foram a compra de animais para reprodução e o tamanho do rebanho, representado pelo número de fêmeas na propriedade. O risco de infecção, medido pelo *Odds Ratio*, para os rebanhos que compravam reprodutores foi de 1,25 [IC 95%: 1.12 – 1.40]. O número de fêmeas no rebanho aumentou o risco de infecção, tendo como base de comparação os rebanhos

com menos de 30 fêmeas. O OR foi 1.94 [1.68 - 2.23] para os rebanhos com 31 a cem fêmeas, 2.98 [2.55 - 3.49] para aqueles com 101 a 400 fêmeas e 5.56 [4.53 - 6.82] para rebanhos com mais de 400 fêmeas. Esse resultado reforça a ideia, já sugerida pelos estudos de prevalência, de que os sistemas de produção pecuária mais extensivos, caracterizados por grandes rebanhos onde são frequentemente introduzidos novos animais, estão mais expostos à brucelose bovina, o que poderá explicar a prevalência alta encontrada em estados das regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil.

*Financiado parcialmente pelo Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008.

¹Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Laboratório de Epidemiologia Veterinária, CP 4508, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil.

E-mail: analourdes@unb.br

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil. ³Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Saúde Animal, Brasília, DF, Brasil.

Variáveis de risco associadas à ocorrência da leptospirose e às taxas reprodutivas em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) na região da Nhecolândia, Corumbá, MS, Brasil

Risk variables associated with the occurrence of leptospirosis and reproductive rates in pampas deer (Ozotoceros bezoarticus) in the region of Nhecolândia, Corumbá, MS, Brazil

Péres, I.A.H.F.S.¹; Vasconcellos, S.A.²; Morais, Z.M.²; Oliveira, C.E.²; Rosinha, G.M.S.³; Soares, C.O.²; Tomas, W.M.⁴; Pellegrin, A.O.¹

A *Leptospira interrogans* é um dos principais agentes etiológicos que afetam um grande número de espécies domésticas, selvagens e o homem. O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) compartilha dos mesmos hábitos biológicos dos ruminantes domésticos no Pantanal, competindo pelos mesmos alimentos e sendo acometido pelas mesmas doenças. O presente estudo foi desenvolvido no Sudoeste da região da Nhecolândia (Corumbá, MS, Brasil), tendo como objetivo a realização de um inquérito por meio de técnicas sorológicas e moleculares de diagnóstico sobre a frequência da leptospirose em veado-campeiro, além de avaliar as variáveis de risco relacionadas com a leptospirose e associadas à ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes na estação de parição. Foram capturadas e identificadas 56 fêmeas e três machos de veado-campeiro para a obtenção de sangue total e soro sanguíneo para o diagnóstico molecular por PCR e sorológico da leptospirose. Em todas as fêmeas foi realizada ultrassonografia, tendo como resultado uma taxa de gestação de 98,21% (55/56). A proporção de sororreatores pela soroaglutinação microscópica (SAM) foi de 28,81% (17/59) e os sorovares Pomona e Autumnalis foram diagnosticados em 64,71% (11/17) e 29,41% (5/17) dos animais positivos, respectivamente. Utilizando-se os primers *G1/G2* e *lep1/lep2* não foi detectado DNA de *Leptospira* sp. no sangue de nenhum cervídeo. Foram identificadas, como variáveis de risco associadas ao diagnóstico positivo da leptospirose, as temperaturas retais médias acima de 38,76° C e os grupos de cervídeos formados por três ou mais indivíduos. Para a ocorrência de fêmeas de veado-campeiro sem filhotes, durante o período de parição, a primiparidade foi indicada como variável de risco.

Apoio financeiro: Edital 64 CNPq/SDA/Mapa; Sistema Embrapa de Gestão.

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, CP 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

E-mail: igorale.vet@gmail.com

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

³Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Embrapa, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

Padronização do diagnóstico para as diarreias causadas por *Clostridium difficile* em animais domésticos

Standardization of the diagnosis for Clostridium difficile associated diarrhoea in domestic animals

Silva, R. O. S.^{1*}; Pires, P. S.¹; Salvarani, F. M.¹; Passarella, A. I. T.¹; Queiroz, L. F.¹; Assis, R. A.²; Santos, R. L.¹; Lobato, F. C. F.¹

Clostridium difficile é um agente causador de colite em humanos. Em medicina veterinária, é responsável por diarreia profusa em potros e tem sido considerado o principal agente causador de diarreia neonatal não controlada em suínos. O diagnóstico é baseado na detecção das toxinas A/B por soroneutralização celular (SNC), método considerado como padrão ouro, ou por ELISA. Além disso, a genotipagem do agente fornece informações importantes com relação à epidemiologia e potencial de virulência das estirpes isoladas. O objetivo do presente trabalho foi padronizar a detecção das toxinas A/B em linhagem contínua de célula e uma PCR para detecção dos genes codificadores das toxinas A, toxinas B e toxina binária de *C. difficile*. A SNC padronizada em células VERO demonstrou-se mais sensível que dois kits de ELISA comerciais e tem-se mostrado eficiente para o diagnóstico em espécimes clínicos de leitões e potros. Com a PCR, foi possível o isolamento e genotipagem de amostras isoladas de cães, bovinos, leitões e equinos, pela primeira vez no Brasil. O próximo passo será a avaliação, com base na SNC, dos kits de ELISA comerciais em busca do mais sensível e específico por espécie doméstica. Além disso, planeja-se a avaliação da sensibilidade das estirpes de *C. difficile* isoladas frente aos antimicrobianos comumente utilizados em medicina veterinária.

Apoio financeiro: CNPq, Fapemig e Capes.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: flobato@vet.ufmg.br

²LANAGRO, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

Diagnóstico retrospectivo de agentes causadores de mionecroses, por imunohistoquímica, em ruminantes no Mato Grosso do Sul, Brasil

Retrospective diagnosis of causative myonecrosis by immunohistochemistry in ruminants in state of Mato Grosso do Sul, Brazil

Pires, P. S.^{1*}; Ecco, R.¹; Silva, R. O. S.¹; Araújo, M. R. De²; Salvarani, F. M.¹; Passarella, A. I. T.¹; Queiroz, L. F.¹; Assis, R. A.³; Heneine, L. G. D.⁴; Santos, R. L.¹; Lobato, F. C. F.¹

Dentre as clostridioses, as mionecroses são infecções necrosantes causadas por uma ou pela associação das seguintes bactérias do gênero *Clostridium*: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. Trata-se de uma doença que acarreta prejuízos significativos para a pecuária brasileira, devido à elevada taxa de letalidade. A imunohistoquímica (IHQ), uma importante alternativa para o diagnóstico dessas doenças, no País, permite a utilização de materiais fixados em formol, aumentando o prazo entre a coleta e processamento laboratorial, sem interferir na confiabilidade do diagnóstico. Além disso, essa técnica viabiliza o estudo epidemiológico da frequência dos clostrídios histotóxicos, auxiliando a indústria brasileira produtora de vacinas a adequar os imunógenos oferecidos. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma IHQ para detecção de clostrídios histotóxicos e aplicá-la no diagnóstico etiológico, em um estudo retrospectivo. A padronização da IHQ foi realizada em tecidos obtidos de cobaios experimentalmente infectados com cepas de referência de *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*, por meio da técnica da estreptavidina e biotina marcada. O diagnóstico etiológico das mionecroses foi realizado em materiais de ruminantes enviados pela Escola de Veterinária, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, MS. Foram analisadas amostras de 28 bovinos e de quatro ovinos que morreram entre os anos de 2000 e 2010, com sinais clínicos e histopatológicos compatíveis com mionecrose. A IHQ mostrou-se específica para a detecção dos clostrídios histotóxicos nos tecidos de cobaios experimentalmente infectados. No diagnóstico etiológico retrospectivo, *C. chauvoei* foi o agente mais frequente (73,3%), seguido por *C. perfringens* tipo A (53,3%), *C. septicum* (33,3%), *C. sordellii* (13,3%) e *C. novyi* tipo A (10%). Alterações autolíticas leves e moderadas foram encontradas em 25% (n = 8) e 6% (n = 2) dos casos, respectivamente. No entanto, as lesões histológicas associadas aos numerosos bacilos detectados pela IHQ possibilitaram o diagnóstico final. Diante de métodos como a IFD, a análise do estado de conservação do material recebido tende a ser limitada a uma avaliação macroscópica. Porém, a histologia associada à IHQ permite a determinação dos parâmetros que permitem uma maior confiabilidade no diagnóstico laboratorial das mionecroses. Embora *C. perfringens* tipo A seja incriminado como causador de gangrena gasosa em humanos, o mesmo é raramente descrito em ruminantes, sendo este o primeiro estudo que contemplou a análise da frequência de *C. perfringens* tipo A. Apesar de ter sido um dos mais frequentes causadores de gangrena gasosa, ele compõe apenas uma das vacinas comercializadas no País.

Apoio financeiro: CNPq, Fapemig e Capes.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG.

E-mail: flobato@vet.ufmg.br

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Lanagro, Pedro Leopoldo, MG, Brasil. ⁴Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Ribotipagem automatizada e resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella* spp. isoladas do programa de redução de patógenos (PRP)

Automated ribotyping and antimicrobial resistance in samples of *Salmonella* spp. isolated of the pathogen reduction program (PRP)

Oliveira, V. G. S.¹; Gaspari, M. V.¹; Marques, F.¹; Santos, A. dos²; Freitas, J. B.³; Pignatari, A. C. C.¹

Infecções humanas causadas por *Salmonella* spp. são um importante problema de saúde pública. Dados norte-americanos estimam que anualmente são diagnosticados 1,4 milhões de novos casos, cerca de 17 mil hospitalizações e 585 mortes. Para cada caso confirmado pelo CDC, outros 38 não são reportados e 95% estão associados ao consumo de alimentos contaminados. A identificação dos sorotipos do gênero *Salmonella* é importante para a caracterização de surtos em infecções humanas e na cadeia epidemiológica relacionada a produtos alimentares. No Estado de São Paulo, o aumento no isolamento de *Salmonella enteritidis* tem sido observado desde 1993, em infecções de origem humana e não humana. Esse clone epidêmico isolado na década de 90 foi caracterizado como pertencente ao fagotipo PT-4 e a um único ribogrupo e a resistência aos antibióticos foi observada principalmente em isolados provenientes de pacientes hospitalizados. Para o tratamento de infecções humanas sérias por *Salmonella*, os antibióticos ciprofloxacina e ceftriaxona são os recomendados. Antibióticos como a enrofloxacin são utilizados em animais e podem estar relacionados ao desenvolvimento de resistência à ciprofloxacina, no tratamento de infecções humanas. A resistência aos agentes β-lactâmicos incluindo a terceira geração das cefalosporinas tem sido descrita em surtos de infecções hospitalares. O presente estudo foi desenhado para avaliar a resistência antimicrobiana e caracterizar os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados do Programa de Redução de Patógenos (PRP) - Ministério da Agricultura do Brasil. No total, foram analisadas 1781 *Salmonella* spp. isoladas de frangos e perus de corte 2005-2009, de diferentes matadouros e laboratórios certificados. Os isolados foram testados pela técnica de disco-difusão contra os seguintes antibióticos: tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina/sulbactam, enrofloxacin, ceftriaxona, gentamicina, cloranfenicol e ciprofloxacina. A tipagem molecular foi efetuada pela técnica de ribotipagem automatizada e os genes de resistência foram pesquisados pela reação em cadeia da polimerase nos isolados que apresentaram resistência fenotípica. Foram detectados 53 sorotipos diferentes e os mais prevalentes foram Enteritidis, seguido por Typhimurium e Schwarzengrund/Bredeney. Ribogrupos mais prevalentes foram: 202-S-1 e 205-S-5 nos sorotipos Enteritidis e Typhimurium respectivamente. Resistência aos antimicrobianos foi detectada na seguinte ordem decrescente: tetraciclina (22,23%), ampicilina (9,48%), sulfametoxazol/trimetoprim (5,78%), ampicilina/sulbactam (5,61%), enrofloxacin (4,88%), ceftriaxona (4,54%), gentamicina (4,15%), cloranfenicol (3,25%) e ciprofloxacina (0,50%). Entre os isolados resistentes à tetraciclina a predominância foi do gene *tetA*. Dentre os isolados resistentes à sulfa/trim e ao cloranfenicol a predominância foi dos genes *sulI* e *qacEΔ1* respectivamente. Foram detectados os genes *qnr*, principalmente o *qnrB*, nos isolados resistentes à enrofloxacin. Para os isolados resistentes aos β-lactâmicos, foram detectados os genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCMY-1* e *blaCMY-2*. Já os genes *aac6-1b*, *blaPSE*, *blaOXA*, *catA1* e *paspp-flor-like* não foram detectados.

¹Universidade Federal de São Paulo, Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Rua Leandro Dupret, 188, CEP 04025-010, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: vinicius.sales@lemc.com.br

²Laboratório Nacional Agropecuário, Campinas, SP, Brasil.

³Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Brasília, DF, Brasil.

Avaliação da dispersão de bezerras por rebanhos e atuação do projeto de apoio à saúde agropecuária (pasa) no índice de vacinação para brucelose bovina, norte de Minas Gerais, Brasil

Evaluation of calf distribution by herd and effectiveness of "Projeto de Apoio à Saúde Agropecuária (Pasa)" on vaccination level for bovine brucellosis on north of Minas Gerais, Brazil

Cardoso, D. L.¹; Vieira, L. C.²; Rocha, C. M. B. M.³; Costa, G. M.³; Lucci, J.^{3*}

A vacinação obrigatória de fêmeas de três a oito meses é uma das principais ações do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil. O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), com o apoio da Vallée, executa o Projeto de Apoio à Saúde Agropecuária (Pasa) desde 2002. Seu princípio é desenvolver metodologias educativas para promover a sanidade animal e consciência para sustentabilidade e saúde. O Pasa tem inovado na inclusão social, ocupação e renda de pequenos agricultores, fixando o homem no campo. Os Agentes de Saúde Agropecuária (ASA) realizam vacinações para buscar os índices acima de 80% recomendados pelo Ministério da Agricultura (Mapa). Com o objetivo de avaliar a relação entre os índices de vacinação e a distribuição de animais nos rebanhos e atuação do Pasa, pois a maior dispersão de animais em inúmeros rebanhos dificulta a ação de vacinação, foram coletados dados do cadastro do IMA de 1/1/2007 a 31/12/2007. Foram estudados 77 municípios do norte do Estado de Minas Gerais, desses 11 com o Pasa em funcionamento, a mais pobre região do Estado. É caracterizada por escassez de centros urbanos e profissionais autônomos, rebanhos com baixa tecnologia e baixa qualidade da terra. O clima é quente, beirando o semiárido, com longos períodos de estiagem. As análises foram efetuadas no SPSS 18.0. Foram retirados dados considerados “outliers”. Foi realizada a análise descritiva de todas as variáveis levantadas e calculadas a correlação de Pearson e regressão linear simples e múltipla considerando-se como variável dependente a “percentagem de vacinação” e como independentes a “presença/ausência do PASA” e a “% de rebanhos com mais de nove bezerras em idade 0-12 meses”. O nível de confiança utilizado foi de 95%. A média de vacinação foi de $69,69 \pm 19,47$ e de “percentagem de rebanhos com mais de nove bezerras” foi de $71,88 \pm 16,47$, com correlação de 49,2% ($p = 0,000$). A cada 1% que aumenta a concentração de “rebanhos maiores de nove bezerras” há um aumento de 0,581 na “% de vacinação”. “Rebanhos que possuem Pasa” têm em média 29,27% a mais de vacinação (IC23,95-34,59; $p = 0,000$). Municípios sem Pasa têm média de vacinação de $65,50 \pm 17,75$ e com $94,77 \pm 5,02$. No modelo múltiplo, os incrementos médios ajustados para “com Pasa” = 29,16 e a cada “% de rebanhos maiores” = 0,58 ($p = 0,000$). Concluímos que é fundamental a presença do Pasa naqueles municípios em que há maior dispersão de bezerras.

*Bolsista de Iniciação Científica, UFLA.

¹Instituto Mineiro de Agropecuária, Praça Leopoldo Dias, 55, CEP 37260-000, Perdões, MG, Brasil.

E-mail: perdoes@ima.mg.gov.br

²Vallée, Montes Claros, MG, Brasil. ³Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Contamination by mycotoxins in dairy production systems, Paraná State, Brazil*

Contaminação por micotoxinas em sistemas de produção leiteira no Estado do Paraná, Brasil

Ramos, C. E. C. O.¹; Santos, G. T.¹; Damasceno, J. C.¹; Kazama, R.²; Netto, D. P.³; Vieira, T. S. W. J.³

Aiming to identify and characterize milk and feeds contamination by mycotoxins it were monitored 96 milk farms in 2009/2010. The study was made in three regions of Paraná state, representatives of dairy production according

to report of Ipardes in 2009. Two kinds of data were collected: samples of feedstuff offered to herd, milk, water and in the other hand, production systems data, collected by a guided interview and questionnaire. Toxicology analysis was made according to methodology described by Soares e Rodriguez-Amaya for feedstuff and by ELISA immunoassay kit for aflatoxin M₁ – AFM₁ in milk. Comparison for regions and seasonal variation of contamination was analyzed by Generalized Linear Models – GLM. Data of milk contamination by mycotoxins and their sources were analyzed under path analysis method. Information collected by questionnaire was related to: storage process, type of feedstuff and supply period of these feeds. Contamination prevalence was 29.2% of all feed samples for mycotoxins. The main contamination by mycotoxins was related to corn and these byproducts ($p < 0.05$), especially commercial concentrates. On the other hand, aflatoxins were predominant ($p < 0.05$) over the other mycotoxins metabolites, overall the aflatoxin B₁ – AFB₁. Milk contamination measured for AFM₁ presented seasonal variation ($p < 0.05$), lower concentrations in rain periods ah higher in dry periods. This can be explained for the increase of concentrates, silage and hay supply in dry period, due to restriction in the forage mass production. There was no effect for regions concerning to AFM₁ concentrations, but the range of variation was large, 0.12 to 1.20 µg/L. This shows that the Dairy Production Systems – DPS in farms are widely heterogeneous in terms of practices and this interference in contamination of dairy production by mycotoxins. The main source of milk contamination (AFM₁) was the presence of metabolites of aflatoxins in feedstuff, independent of the feed source. Corn and those byproducts have weak direct effect in AFM₁ concentrations. This means that the contamination by aflatoxins is generalized among the feed sources and there is no one main source for contamination in analyzed feeds. The major direct effect on AFM₁ (0.51) was observed for AFB₁, which is reinforced by information available in literature. AFB₁ is the major metabolic precursor of AFM₁, in mammal's organisms. We conclude that aflatoxins are the main mycotoxins contaminants in feeds and it is widely spread in all studied regions. There is a seasonal variation in those concentrations in feed, consequently in AFM₁ milk levels.

*This research was supported by CNPq/Mapa/SDA, announcement 64/2008 – line 2.

¹Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

E-mail: jaguaricarlos@gmail.com

²Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor “João David Ferreira Lima Trindade”, Florianópolis, SC, Brasil.

³Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Detection of pathogens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) in honey with multiplex PCR and its use in brazilian samples*

Detecção de patógenos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em mel com PCR multiplex e seu uso em amostras brasileiras

Puker, A.^{1**}; Teixeira, É. W.²; de Paula, S. O.³; Pinto, F. A.¹; Silva, I. C.^{4***}; Santana, W. C.⁵; Message, D.^{1****}

Several pathogens attack the bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) around the world, such as the bacteria *Paenibacillus larvae* and the fungi *Ascosphaera apis*, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Their distributions in some parts of the world, such as Brazil, are not fully known not only because

of the difficulty of collecting samples such as in our large country, but also because of the time and the cost of diagnosis techniques involved. The analyze of the presence of the spores of honeybee pathogens in honey has shown to be a good strategy for epidemiological studies and early detection before the expression of symptoms in the colony. Therefore it is important the standardization of techniques for rapid diagnosis to facilitate the safe performance of the epidemiological surveys, and controlling the spread of these microorganisms. Here, we it was standardized a multiplex PCR technique for simultaneous detection of four pathogens of *A. mellifera*: *A. apis*, *N. apis*, *N. ceranae* and *P. larvae* in honey. This technique was used in honey samples from some Brazilian states. Sterile honey samples (20 mL) were artificially contaminated with all selected pathogens. These positive samples were diluted in 30 mL sterile water followed by centrifugation. DNA from pellet was extracted using a commercial kit. A Multiplex PCR was standardized using specific primers and a common melting temperature. Recommendations of national legislation were used for preparation of honey solutions submitted to the developed technique. Also it were prepared samples of honey collected from brood area, extracted honey from supers by beekeepers and acquired from different commercial establishments used to validate the multiplex PCR, as well as to conduct a preliminary assessment of the distribution of pathogens (*A. apis*, *N. apis*, *N. ceranae* and *P. larvae*). The standard technique of this study was effective for diagnosing of the four pathogens in honey of *A. mellifera*: *A. apis*, *N. apis*, *N. ceranae* and *P. larvae*. Primers used in both PCR reactions (monospecific and multiplex) for DNA amplification of the target pathogens were precise and sensitive, resulting in products of expected sizes. The formation of nonspecific fragments and/or other artificial PCR products was not observed in multiplex PCR reactions. Thus, this method was suitable for simultaneous detection of the selected pathogens of *A. mellifera* extracted from honey, and probably can be used in other hive products with minor modifications. The selected pathogens were not found in the honey samples analyzed with this multiplex PCR standardized.

*Capes, CNPq, Mapa.

**Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa.

***Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

****Bolsista DTI-1/CNPq (Proc.578293/2008-0/CNPQ).

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, Av. Peter Henry Rolfs, s/nº, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

E-mail: pukeragro@gmail.com

²Polo Regional do Vale do Paraíba, Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil.

³Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, MG, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁵Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, Viçosa, MG, Brasil.

Honey bee health and losses in Brazil

Sanidade apícola e perdas no Brasil. Sanidade apícola e perdas de colônias no Brasil

Teixeira, E. W.^{1****}; Message, D.^{1,2*}; Alves, M. L. T. M. F. A.¹; Santos, L. G.^{1***}; Simões, Z. L. P.²; Lazzarini, K. R. G.^{2**}; Bitondi, M. M. G.²; Lourenço, A. P.²; Silva, I. C.^{2*****}; Chen, Y.³; Evans, J. D.³; Pettis, J. P.3

In Brazil, though the Africanized honeybees are considered resistant and tolerant to most of bee pathogens and parasites, in recent years considerable losses have been reported in some localities, especially in the Southeast and Southern states. Since the phenomenon that is affecting honeybees around the world has been observed also in Brazil (with less intensity), we proposed a research project aiming to determine possible causes for such decline or losses, and in particular to test the likelihoods of specific predicted causative agent(s) for this condition. Alternative approaches, including genetic screening can be extremely useful and can accelerate important discoveries related to the current problem. Here it was present an overview about these activities and a summary (2009 to 2011) of the situation in the two regions. No symptoms of the American Foul Brood were detected and analysis of more than 600 honey samples presented negative results, using the Brazilian official method for microbiological detection of *Paenibacillus larvae* in honey (molecular techniques confirmed such absence). *Leptomonas apis*, and *Spiroplasma apis* were also detected in São Paulo State samples. One of the main sanitary problems of the Africanized bees (beekeeper loses, sometimes, all colonies during less than one-month period) is Brazilian Sacbrood-like disease, caused by the toxic effects of the *Stryphnodendron* spp pollen in the Atlantic Forest and Savannah regions (Sac Brood Virus has not been detected in these colonies and the symptoms are similar). Nowadays, the selection for resistance is under evaluation. Other brood mortality has been also observed during the last years showing anomalous symptoms. In adult bees different type of viruses such as ABPV, DWV, BQCV, IAPV have been detected, and previously CWV, FV and CBPV. Accidents with insecticides have been related. Collapse and mortality of adult bees have been detected in sugar cane areas where neonicotinoids normally are used, but in areas without sugar cane crop too. *Nosema ceranae* is present in many apiaries, showing high prevalence. The obtained results indicated that *N. ceranae* infection seems to suppress bees immune response of *A. mellifera* due the peptides transcription of the antimicrobes abaecina and himenoptaecina. *N. apis* was detected only in some localities of Santa Catarina and Paraná. *Varroa destructor* is present throughout apiaries, but causing no apparent direct economical damages. Replacement of the queens from beehives showing symptoms has been recommended, avoiding chemotherapeutic drugs usage. There is a critical need to increase the number of technicians and laboratories dedicated to bee pathology in several regions of the country in order to have a better control of the sanitary situation in the apiaries. Pathological, epidemiological, and widespread studies must be conducted as no single pathogen seems to be predominant in declining bee colonies.

Supported by CNPq/Mapa/SDA (Edital N° 064/2008).

*Fellowship, CNPq: DTI 1

**Fellowship, DTI 2

***Fellowship IC/PIBIC 2009-2011 e ITI A - 2011

****Fellowship PDT II

*****Fellowship, Doctorate

¹Polo Regional do Vale do Paraíba, CP 7, CEP 12400-970, Pindamonhangaba, SP, Brasil.

E-mail: erica@apta.sp.gov.br

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

³USDA-ARS Bee Research Laboratory, Beltsville, MD, USA.

Mercury, lead, arsenic and cadmium in fresh and frozen farmed shrimp and pond water from three shrimp farms

Mercúrio, chumbo, arsênio e cádmio em camarões frescos e congelados coletados em três fazendas

Botaro, D.; Longo, R. T. L.; Galvão, P. M. A.; Lino, A. S.; Torres, J. P. M.; Meire, R. O.; Pizzochero, A. C.; Malm, O.

Trace metals are not obvious pollutants present in shrimp farm effluents. However, some trace metals are present as natural components in aquafeeds, as impurities in fertilizers or as active principles of pesticides, which can be accumulated in shrimp tissue. It were analyzed 90 muscle samples of fresh and frozen farmed shrimp and pond water collected in three farms in Brazil, between September 2008 and March 2011. It were determined total mercury concentrations by a flow injection mercury system and, lead, arsenic and cadmium concentrations by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. Mercury levels in the farmed shrimp ranged from 0.01 – 0.18 mg.kg⁻¹ in fresh shrimp, and from 0.002 – 0.008 mg.kg⁻¹ in frozen shrimp (wet weight). A similar behaviour was observed to lead concentrations, since frozen shrimp presented markedly lower lead concentrations (0.30 – 0.89 mg.kg⁻¹) than fresh shrimp (0.92 – 2.89 mg.kg⁻¹). In the case of arsenic, were observed concentrations of 0.01 – 0.77 mg.kg⁻¹ in fresh shrimp muscle, and were no detected concentrations of this trace metal in muscle of frozen shrimp (Limit of detection of 0.002 mg.kg⁻¹). The shrimp freezing process consists of a preliminary washing thoroughly in chlorinated water (5 ppm) to remove any remaining mud or sand, and to reduce bacterial contamination. The shrimp are drained as much as possible and are then ready for freezing through quick-freezing tunnel (individually quick frozen). There is no evidence indicating that this process contributed to the reduction of trace metals levels in frozen shrimp, but is clear that lead, arsenic and mercury levels are markedly lower in frozen than fresh shrimp. It was observed low concentrations of trace metals in pond water and also in shrimp muscle. In relation to the monitored years, in 2008 it was observed a slightly higher concentration of all trace metals in fresh shrimps compared to other years. Episodes of intensive precipitation caused recurrent devastating floods in the region in 2008, and caused harm to farms evaluated. Thus, increased concentrations of these trace metals in the rainy season may be related to resuspension of particles deposited in the sediment of the bottom in the ponds and therefore available for incorporation into these trace metals by aquatic biota. It can be concluded that farmed shrimp in Brazil is safe for human consumption. Thanks go to CNPq/ MAPA/SDA 577906/2008-9 for financial support and scholarships conceded.

*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica “Carlos Chagas Filho”, Laboratório de Radioisótopos “Eduardo Penna Franca”, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: danibot13@gmail.com*

Total mercury in feed, muscle and liver of farmed Nile tilapia

Mercúrio total em rações, filés e fígado de tilápia do Nilo de pisciculturas

Botaro, D.; Longo, R. T. L.; Galvão, P. M. A.; Lino, A. S.; Torres, J. P. M.; Meire, R. O.; Pizzochero, A. C.; Malm, O.

Fish consumption is considered the most important source of contaminant exposure for humans beings, and farmed fish can be exposed to contaminants

via feed supply. Total mercury concentrations (THg) were determined in the muscle, liver and feed of farmed Nile tilapia (juveniles and adults) from four different fish farms (net cage and pond systems), by a flow injection mercury system. Mercury concentrations observed in muscle and liver were lower than the values recommended by Brazilian regulatory agency (Anvisa) for fish of 500 µgTHg.kg⁻¹ and fish farm NC₁ showed the highest THg concentrations when compared to the other fish farms. There are reports of strong gold exploration around 1987 in this region, where more than 100 ferries worked in mining this metal. The low THg concentrations found in muscle of farmed tilapia in this study confirm the low tendency of these fish to accumulate Hg, since they are less exposed to this contaminant than wild tilapias. Other factors, such as higher growth rate and shorter life span when compared to wild fish can contribute to marked reductions in THg concentrations. Body lipid content can also influence contaminant concentrations accumulated in an organism. Lipid concentrations in the present study in fish muscle ranged from 0.7 to 4.3%, noting that lipid levels were higher in NC than in PS fish farms. Thus, higher THg concentrations in the muscle tissue with lower lipid concentrations (PS farms) were observed. The low THg concentrations found in the analysed fish feed (5.2 – 33.2 µg.kg⁻¹) can be also responsible for the low concentration in fish muscle. Therefore, continuous monitoring of contaminant concentrations in fish feed is necessary due to variations in the use of ingredients, which cause variations in the concentrations of undesirable substances in commercial feeds. In relation to tissue analysis, a statistically significant difference (P < 0.05) between Hg accumulation in liver and muscle was observed, where the liver presented the highest concentrations. Regarding fish age difference, a statistically significant difference (P < 0.05) was observed when comparing Hg accumulation between adults and juveniles, with larger fish having higher THg concentrations than smaller fish. Differences in bioaccumulation rates can be related to the different nutritional needs of fish in different life stages. Thus, fish age is an important factor, due to changes in food supplies, as well as the increased exposure time of the animals to Hg.

Financial support and scholarships CNPq/Mapa/SDA 577906/2008-9.

*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica “Carlos Chagas Filho”, Laboratório de Radioisótopos “Eduardo Penna Franca”, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: danibot13@gmail.com*

Development of an immunoassay for the differential diagnosis of trypanosomiasis of veterinary interest: A preliminary proteomic survey of *Trypanosoma evansi* trypomastigotes using lc/ms/ms approach for differential diagnostics

*Desenvolvimento de um imunoenensaio para diagnóstico diferencial da tripanossomíase de interesse veterinário: Um levantamento preliminar da proteômica de tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* usando a abordagem LC/MS/MS para o diagnóstico diferencial*

Duarte, D. P.^{1*}; Ott, T.²; Lazzarotto, C. R.¹; Aguiar, F. C.¹; Schneider, B.¹; Ferreira, H. B.²; Miletti, L. C.¹

The veterinary trypanosomes *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* are parasites that affect many animals species such as horses, camels and bovines causing significant economic losses to livestock industry around

the world. Recently, human cases have been described. In Brazil, outbreaks of these parasites have been reported in several states from north to south. The differential diagnosis is not efficient and there is no differential field test to be used. Thus using the proteomic approach, we began the study of proteins differentially expressed in each of the parasites. The aim of this study is to identify proteins expressed by *T. evansi* trypomastigotes in mouse experimental infections, with emphasis in the identification of potential drug targets and differential diagnostic antigens. In a preliminary proteomic survey using LC/MS/MS, 33 proteins from *T. evansi* trypomastigotes were identified and assigned to COG functional groups, with most of them belonging to the group of cellular processes and signaling and metabolism proteins. Among the identified proteins there were cyclophilin and cysteine peptidase, which have been described as virulence factors and potential drug targets in other trypanosomatids, for being involved in parasite growth and survival in mammalian hosts. Furthermore, we identified several glycolytic enzymes, such as ATP-dependent phosphofructokinase, enolase and glycosomal fructose-bisphosphate aldolase. In *T. evansi* these enzymes are especially important for flagellar movement, a process that is dependent of the environmental glucose concentration. Considering that flagellar movement is essential for parasite infection, glycolytic enzymes also become attractive targets for future studies on their drug target potential. The *T. evansi* proteomic survey will also be extended with the analysis of more trypomastigote samples by both LC/MS/MS and 2DE-MALDI-MS/MS, in order to provide a comprehensive coverage of the repertoire of proteins expressed by this stage of the parasite. For the identification of antigenic proteins with potential for use in “surra” immunodiagnosis, we will also perform 2DE-immunoblots with sera from animals infected with *T. evansi* trypomastigotes.

Supported by: CNPq, Finep and Fapesp.

*Fellowship from CNPq.

¹Universidade do Estado de Santa Catarina, Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, Av Luiz de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil.

E-mail miletti@cav.udesc.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Porto Alegre, RS, Brasil.

Detecção de polimorfismos do gene da proteína priônica no rebanho ovino nacional: métodos e aplicabilidade à seleção para resistência ao Scrapie*

Detection of polymorphism of the prion protein gene in national sheep flock: method and applied for selection and resistance to Scrapie

Santos, C. R.¹; Mori, E.²; Leão, D. A.³; Maiorka, P. C.¹

Scrapie ou paraplexia enzoótica dos ovinos é uma doença neurodegenerativa fatal que acomete ovinos e raramente caprinos. O agente causador é chamado de príon (PrP^{Sc}), uma forma alterada da proteína priônica normal (PrP^C). A PrP^C está presente na membrana celular de diversas células dos animais, principalmente no SNC. A infecção pelo PrP^{Sc} pode ocorrer mais comumente por três formas: hereditariedade, consumo de alimentos oriundos de animais portadores da PrP^{Sc} ou por eventuais polimorfismos. Os polimorfismos ocorrem nos códons 136, 154 e 171 do gene PRNP, que é o responsável pela síntese da proteína priônica. Os animais podem ser susceptíveis ou resistentes, de acordo com as

seqüências alélicas observadas nos referidos códons. São considerados altamente susceptíveis ao scrapie, animais que apresentem no seu genótipo a combinação VRQ para o gene PRNP, independente do outro alelo. São considerados como susceptíveis ao scrapie, ovinos que apresentem no seu genótipo a combinação alélica ARQ, AHQ, ou ARH para o gene Prnp. São considerados resistentes ao desenvolvimento de scrapie os ovinos que apresentem no genótipo dois alelos ARR. No Brasil, ocorreram apenas casos de animais que foram importados, sendo o País considerado livre da doença. Neste trabalho, foi realizada a genotipagem dos diferentes polimorfismos associados ao desenvolvimento do Scrapie e a categorização em animais susceptíveis e resistentes. Foram sequenciadas 118 amostras provenientes de ovinos nacionais da raça Santa Inês. Dessas amostras, foram identificados seis alelos e 11 genótipos (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/VRQ, AHQ/AHQ, ARR/ARR, ARR/AHQ, VRQ/VRQ, ARQ/TRQ, TRR/TRR, TRQ/TRQ), dentre os quais o genótipo ARQ/ARQ teve prevalência de 56,7%. Apenas 1,69% das amostras analisadas possuem o genótipo ARR/ARR, considerado resistente à doença. Em nove amostras, pôde ser observada a presença da Tirosina no códon 136, culminando com os seguintes genótipos: A/T e T/T. Até o presente momento, esses polimorfismos só foram descritos em publicações internacionais e são considerados como observações raras. Esse é o primeiro relato nacional e o primeiro relato envolvendo a raça Santa Inês. O efeito na susceptibilidade ou resistência nos animais portadores da homozigose T/T no códon 136 ainda não está totalmente elucidada, já a heterozigose A/T não altera a susceptibilidade à doença. Esses resultados apresentam grande variabilidade genética relacionada à raça Santa Inês e a baixa frequência do alelo ARR no rebanho nacional demonstra que programas de melhoramento genético envolvendo a raça Santa Inês devem ser adotados para aumentar a resistência ao desenvolvimento da doença.

*CNPQ Edital: 064/2008

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, Laboratório de Neuropatologia Experimental e Comparada, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: caio-patologia@usp.br

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, São Paulo, SP, Brasil.

Determinação de microorganismos responsáveis pela deterioração em carnes refrigeradas embaladas a vácuo*

Determination of microorganisms responsible for deterioration in vacuum packed chilled meat

Fornazari, A. C. Z.¹; Contreras-Castillo, C. J.¹; Porto, E.¹; Macedo, M. L. H.²; Junqueira, V. C. A.³; Kabuki, D. Y.⁴

O estufamento de embalagens a vácuo de carnes refrigeradas, também conhecido como *blown pack*, é atribuído a bactérias psicrófilas e psicrotóxicas, dentre as quais fazem parte algumas espécies de clostrídios e enterobactérias. Essa deterioração é caracterizada pela intensa distensão da embalagem, levando à produção de gases e odores desagradáveis. O objetivo deste trabalho

foi avaliar a presença dos principais microorganismos envolvidos na deterioração tipo *blown pack*, com ênfase nas famílias de clostrídio e enterobactéria. Foram analisadas 13 amostras de carnes, bovinas refrigeradas embaladas a vácuo e estufadas, provenientes de frigoríficos dos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. Os cortes utilizados para as análises foram contrafilé, músculo, alcatra, picanha e filé de costela. As amostras apresentavam características de deterioração tipo *blown pack* dentro da data de validade, com períodos de armazenamento variando de 30 a 120 dias. Foram realizadas análises convencionais de cultivo visando ao isolamento de *Clostridium estertheticum* nas amostras de carne e identificação dos isolados obtidos pela técnica de PCR. Para o isolamento de enterobactérias, foram realizadas análises convencionais de microbiologia e para identificação dos microorganismos viáveis e cultiváveis nas amostras foi utilizado o kit API 20 E. As espécies de enterobactérias cultivadas e identificadas foram *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter braakii*, *Pantoea* sp. e *Yersinia enterocolitica*, sendo essa última potencialmente patogênica e de interesse em saúde pública. Observou-se que dentre as espécies de enterobactérias identificadas, a *H. alvei* foi predominante nas amostras avaliadas e não houve detecção de *C. estertheticum* nas amostras de carne.

*MCT/CNPq/Mapa n° 64/2008 - Ações de defesa agropecuária - Linha 2 - Projetos de Pesquisa Científica Tecnológica e Inovadora.

¹Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

E-mail: annaari@hotmail.com

²Universidade Tiradentes, Aracajú, SE, Brasil.

³Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, CENA, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Piracicaba, SP, Brasil.

Diagnóstico, caracterização molecular e estudos da patogenia de agentes infecciosos de importância econômica para a suinocultura brasileira*

Diagnostic, molecular characterization and pathogenesis studies of infectious agents of economical importance for the Brazilian swine production

Ciacci-Zanella, J. R.¹; Schaefer, R.¹; Klein, C. S.¹; Silva, V.S.¹; Caron, L.¹; Piovezan, U.²

A agricultura e pecuária são setores essenciais para a economia do Brasil. Nesse cenário, os altos índices de produtividade e volume de exportações da suinocultura brasileira têm destaque mundial. Considerando-se os fatores de produção, as doenças infecciosas são as maiores ameaças à estabilidade das cadeias produtivas. Portanto, a disponibilização de ferramentas de diagnóstico alavancam pesquisas de etiologia, caracterização molecular, epidemiologia e controle de problemas sanitários em rebanhos suínos. O objetivo deste trabalho foi de oferecer uma carteira de processos e metodologias de diagnóstico para agentes infecciosos de suínos importantes para o mercado interno e exportador. A eleição desses patógenos baseou-se na dificuldade, até então, de realizar uma investigação de agentes considerados exóticos no Brasil, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) e o vírus da influenza suína (VIS). Outros agentes incluem o vírus da doença de Aujeszky, presente em rebanhos suínos domésticos de alguns estados brasileiros, porém de desconhecida epidemiologia e virulência em suínos silvestres. A

pneumonia enzoótica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh), amplamente disseminado na suinocultura brasileira e mundial, também requer métodos de diagnóstico indisponíveis em laboratórios oficiais, embora seja uma doença de certificação opcional para Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas (GRSC), segundo a IN 19, do Mapa. Para detecção de anticorpos e ácidos nucleicos desses agentes, em rebanhos comerciais ou centrais de inseminação, foram coletados soro sanguíneo, fluido oral, suabes nasais e vaginais ou prepuciais e fragmentos de órgãos suínos. Para detecção de anticorpos e agentes, as amostras foram testadas por ELISA e/ou HI (inibição da hemaglutinação) e RT-PCR (reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa) ou nested-PCR e, posteriormente, por imunohistoquímica e isolamento viral. Técnicas de PCR em tempo real foram implantadas para o VIS, para o vírus de influenza pandêmico (pH1N1), para o PRRSV e para o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Para caracterização desses agentes, como os vírus de influenza e Mh, o sequenciamento do genoma foi realizado. Os resultados deste estudo indicaram que para um diagnóstico seguro é necessário um processo ou conjunto de análises que complementem o diagnóstico laboratorial. A disponibilização dessas análises em laboratórios parceiros vai incrementar a vigilância sanitária, favorecendo uma maior competitividade da suinocultura brasileira frente a desafios sanitários atuais e potenciais.

*Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008 (processo n° 578102/2008-0).

¹Embrapa Suínos e Aves, BR 153, km110, CEP 89700-000, Distrito de Tamanduá, Concórdia, SC, Brasil.

E-mail: janice@cnpqa.embrapa.br

²Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

Avaliação da eficácia do tratamento com tripsina em oócitos maturados *in vitro* e embriões fertilizados *in vitro* expostos a sorovares de *Herpes virus bovinus* tipo 1

Evaluation of the effectiveness of treatment with trypsin in in vitro mature oocytes and in vitro embryos exposed to type 1 Bovine herpes virus.

D'Angelo, M.; Pavão, D. L.; Alves, M. F.; Castro, V.; Catroxo, M. H. B.

Técnicas de reprodução assistida melhoram a qualidade e produtividade de rebanhos no mundo todo e têm sido cada vez mais utilizadas. Pesquisas analisando qualidade sanitária dos rebanhos, condições de oócitos e embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* são realizadas mundialmente devido a contaminações que podem ocorrer durante as fases de produção e transferência de embriões. Nesse sentido, a técnica de produção e transferência de embriões torna-se segura desde que seguidas as normas definidas pelo manual da International Embryo Transfer Society (IETS), por meio de tratamento dos oócitos/embriões com tripsina e antibióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento com tripsina na eliminação e/ou remoção do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), estirpe Colorado, em embriões murinos. A detecção viral foi feita pela n-PCR e por efeito citopático em células de linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK). Camundongos fêmeas Swiss, com idade entre seis e oito semanas, foram superovuladas e acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem e idade. Após 24 horas, os zigotos (n = 262) foram divididos em três grupos: grupo controle submetido à lavagem sequencial (CLS), grupo exposto ao vírus (30 µL; título 106,5 vírus/mL) e submetido à lavagem sequencial (ELS) e grupo exposto ao vírus e submetido ao tratamento com tripsina (ETT). Os zigotos e as últimas gotas dos grupos foram separados para o teste

de n-PCR e inoculados em células MDBK para observação de efeito citopático. Todos os grupos, com exceção do CLS, apresentaram resultados positivos para a n-PCR tanto para zigotos quanto para as últimas gotas. Houve a presença de efeito citopático em todos os grupos, exceto no grupo CLS demonstrando a viabilidade do vírus após os tratamentos. Esses resultados demonstraram que o tratamento com tripsina não foi eficaz na eliminação e/ou remoção do BoHV-1. A necessidade de estudos dessa natureza é de fundamental importância ao considerarmos o potencial risco da transmissão de patógenos emergentes e pouco controlados pelas biotécnicas da reprodução, visando, dessa forma, ao controle e à produção de embriões saudáveis.

*CNPq/Mapa: Edital 064 - 578398-2008/7.

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: dangelo@biologico.sp.gov.br

Colapso de colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) no Brasil*

*Colony collapse disorder in Africanized honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) in Brazil*

Message, D.^{1**}; Guidugli-Lazzarini, K. R.^{1***}; Freitas, N. H. A.^{1****}; Simões, Z. L. P.²; de Jong, D.²; Silva, I. C.^{3*****}; Teixeira, É. W.¹

As abelhas *Apis mellifera* L. são responsáveis pela movimentação de 15 bilhões de dólares relacionados à produção agrícola, devido à ação polinizadora de cerca de 1,6 milhões de colmeias nos EUA. No Brasil, essa prática ainda é incipiente, no entanto na cultura da maçã no sul do Brasil são empregadas cerca de 60.000 colmeias para executar a polinização. Nas duas últimas décadas, um forte declínio desses polinizadores tem estimulado cientistas de todo mundo a buscarem os agentes causadores dessas perdas, porém, até o momento, os resultados não são conclusivos. Neste trabalho, foi apresentado um relato de perdas de colônias de abelhas que vem sendo observado no sudeste e sul do Brasil. O primeiro relato de colapso de colmeias, similar à CCD (Colony Collapse Disorder), descrito nos Estados Unidos desde o outono de 2006, foi observado pela primeira vez em duas colmeias na região de Altinópolis, SP, ocorrido entre duas revisões feitas em agosto de 2008 (com intervalo de 14 dias), deixando muito alimento (mel/pólen), poucas crias e abelhas adultas, presença da rainha, ausência de abelhas adultas mortas e de crias doentes. Em abril de 2010, observou-se entre duas coletas de abelhas forrageiras (com intervalo de três dias) em um apiário experimental com 20 colmeias no campus da USP de Ribeirão Preto, SP, a perda de duas colônias com sinais clínicos similares aos da CCD. Entre abril e julho, foram perdidas mais 13 colmeias, no entanto com alta incidência de “crias anômalas ou crias marrons” e morte de abelhas adultas, totalizando 70% de perdas. Entre janeiro e junho de 2011, observou-se o colapso de quatro das cinco colmeias restantes, dessa vez com níveis de infecção de *Nosema ceranae* até então não detectados, chegando a 40 milhões de esporos/abelha. Ao longo dos últimos anos, têm sido reportadas, por apicultores e por fiscais federais/estaduais, altas perdas de colônias nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. Até o momento, análises feitas por PCR em abelhas forrageiras, coletadas de colmeias nas regiões afetadas, têm mostrado a presença dos vírus: IAPV, APV, DWV e BQCV, dos microsporídios *N. ceranae* e *N. apis*, e do ácaro *Varroa destructor*. Embora resultados conclusivos não estejam disponíveis, nos casos

de perdas similares à CCD, nossa hipótese é de abandono anormal da colônia em vez de desaparecimento das abelhas, causado por colapso comportamental que poderia ser resultante de sinergismo envolvendo os patógenos detectados, condições climáticas e possíveis resíduos em doses subletais de inseticidas, que são amplamente utilizados de forma legal e ilegal nas regiões com perdas de abelhas no Brasil.

*CNPq/ Mapa

**Bolsista DTI-1/CNPq (Proc. 578293/2008-0/CNPQ – Ed.064/2008, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Depto. Entomologia/UFV

***Bolsista DTI-2/CNPq (Proc. 578293/2008-0/CNPQ – Ed.064/2008)

****Bolsista ITI/CNPq (Proc. 578293/2008-0/CNPQ – Ed.064/2008)

*****Programa de Pós-Graduação em Entomologia

¹Polo Regional do Vale do Paraíba, Laboratório de Sanidade Apícola, CP 7, CEP 12400-970, Pindamonhangaba, SP, Brasil.

E-mail: dejair.message@gmail.com

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil. ³Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

IDApi, um software para avaliação da apicultura*

IDApi, a software for evaluation of beekeeping

Tassinari, W.S.¹; Lorenzon, M.C.^{2**}; Koshiyama, A.S.¹; Soares Neto, J.³

Atualmente, as empresas públicas e privadas, ligadas à apicultura, procuram identificar os obstáculos do segmento apícola e, por vezes, utilizam censos e levantamentos para diagnósticos, preparo de planos e ações corretivas em torno dos índices de produção. Comumente, os diagnósticos da apicultura são apenas tratados pelos numerários dos fatores de produtividade, como a produção média anual por colmeia e a produção total de seus produtos, sem muitas vezes indicar os aspectos tecnológicos que conduzam à produtividade. Além disso, os levantamentos exigem recursos financeiro e humano substanciais, além de prazos extensivos. Este estudo formulou um índice, chamado de índice de desempenho apícola-IDApi, para auxiliar na avaliação da atual conjuntura da apicultura. Para sua formulação, foram trabalhados os dados extraídos de um levantamento apícola do Estado do Rio de Janeiro (2009). Foi preparado um banco de dados, a partir de questionários (266 variáveis) aplicados aos os apicultores, obtidos por meio de entrevistas dirigidas por técnicos treinados. O modelo estatístico do IDApi foi efetuado por análise exploratória, que criou os escores: 0 a 0,5, o IDApi é fraco; 0,51 a 0,75 é regular; e entre 0,76 a 1,0 é satisfatório. Sua formatação também foi preparada por web designer. O índice se apresenta em apenas um valor, de forma geral ou segmentada, que provém da análise de três principais temáticas da apicultura: instalação, povoamento de apiários e manejo & produção. Particulariza-se a aplicação do IDApi em um estudo de caso, a partir dos dados do levantamento apícola (2009), tomando-se como foco as perdas de colmeias, muitas devido à ocorrência de doenças. Os dados foram organizados em dois grupos: A, obtido de 27 municípios, que apresentavam altas perdas de colmeias por ano ($\geq 20\%$); B, composto por nove municípios, que cerceavam os do grupo A, e nesse caso as perdas são aceitáveis ($< 20\%$). Todas essas análises foram realizadas pelo pacote estatístico R. O IDApi geral foi: GrA IDApi 0.62 [0.60 ~ 0.64]; GrB 0.65 [0.63 ~ 0.68]; As médias são bem próximas (A = 0.75; B = 0.76), porém o GrA apresenta

dois pontos abaixo nas temáticas povoamento, manejo e produção apícolas. Por serem as condições tecnológicas similares entre GRA e GRB, considera-se que o grupo A pudesse estar sendo submetido a fatores impactantes em seu ambiente, que favoreceram as perdas de colmeias e, entre essas, a presença e resistência de patógenos, que vêm causando as doenças. O diagnóstico do IDApi pode ser feito em nível de produtor e para empresas, que podem acessar facilmente as medidas corretivas para aumentar a produtividade de seu plantel e, assim, melhorar o seu IDApi. O IDApi, além de instrumento de diagnóstico e de autoavaliação de atividade, é também de assistência técnica.

*CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008, processo 578134/2009-0.

**Bolsista CNPq.

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Matemática, Instituto de Ciências Exatas, Rod 465, km 7, CEP 23870-000, Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: wtassinari@gmail.br

²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Produção Animal, Instituto de Zootecnia, Seropédica, RJ, Brasil. ³Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Perfil da sanidade apícola em duas regiões do estado de São Paulo, Brasil: apicultura fixa e migratória.

Health profile of honey bees in two regions of São Paulo State, Brazil: fixed and migratory bee keeping

Santos, L. G.^{1,2***}; Message, D.^{1,3*}; Alves, M. L. T. M. F. A.¹; Pinto, F. A.^{4****}; Silva, I. C. da³; Teixeira, E. W.^{2****}

A apicultura brasileira vem se desenvolvendo ao longo dos anos devido à adoção de práticas de manejo adequadas às abelhas *Apis mellifera* africanizadas, incluindo métodos como a apicultura migratória, que proporcionam o aumento de produtividade. Contudo, recentemente, o declínio e/ou colapso de populações de abelhas em todo mundo, inclusive em território nacional, exigiu grande atenção devido aos possíveis prejuízos ocasionados não apenas em relação à obtenção de produtos apícolas, mas, principalmente, em relação à polinização de várias culturas de expressão na produção de alimentos, além da manutenção de biodiversidade. Essas perdas podem estar relacionadas com a incidência e sinergismo entre patógenos, pesticidas e mudanças climáticas, dentre outros fatores. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a incidência e níveis de infecção/infestação de três patógenos de importância na apicultura mundial, em apiários fixos e migratórios, em duas regiões do Estado de São Paulo (Vale do Paraíba e Centro-Leste). Foram obtidas amostras de apiários fixos de quatorze municípios da região do Vale do Paraíba e amostras de apiários fixos e migratórios de cinco municípios da região Centro-Leste do Estado. Amostras de favo de mel foram utilizadas para verificar a presença da bactéria *Paenibacillus larvae*, favo contendo crias operculadas e abelhas adultas presentes na área de cria para avaliar as taxas de infestação do ácaro *Varroa destructor* e abelhas campeiras para obter as taxas de infecção do microsporídio *Nosema* sp., totalizando mais de 1.700 amostras analisadas. Os resultados indicaram que os índices de infecção de *Nosema* sp., bem como de infestação de *V. destructor* nas regiões estudadas são relativamente baixos, não tendo sido constatada a presença de esporos de *P. larvae*. Contudo, para os dois patógenos encontrados, pôde-se constatar elevada prevalência (chegando a 85,2% de colmeias infectadas pelo primeiro e 95,71% infectadas pelo segundo,

apenas no Vale do Paraíba). *Nosema apis* não foi detectado. A avaliação do efeito sazonal para os resultados obtidos indicou que tal fator é determinante na condição sanitária das colônias, sobrepondo as condições do tipo de manejo adotado (fixo ou migratório). A importação de produtos apícolas (geleia real, pólen, mel e cera, além de abelhas rainhas) e o deslocamento de colônias podem estar sendo uma forma de rápida dispersão, contribuindo para introdução de novos patógenos. O monitoramento sanitário de colônias e de produtos apícolas, bem como o melhoramento genético visando à resistência, pode atuar como medidas preventivas evitando, inclusive, o uso de drogas que venham a causar resistência, a exemplo do que ocorre em outros países, além de interferir negativamente no mercado de tais produtos, em virtude de resíduos químicos remanescentes.

Agradecimentos: Trabalho financiado pelo CNPq/Mapa/SDA (Edital N° 064/2008)

*Bolsista CNPq; DTI 1.

**Bolsista CNPq/PIBIC/IC 2009-20011 e ITI A – 2011

***Bolsista CNPq, PDT II

****Bolsista Capes

¹Polo Regional do Vale do Paraíba, CP 7, CEP 12400-970, Pindamonhangaba, SP, Brasil.

E-mail: erica@apta.sp.gov.br

²Universidade de Taubaté, Taubaté, SP, Brasil. ³Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil. ⁴Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Qual o risco de se contaminar por mercúrio ao consumir o mexilhão *Perna perna* L. e o coquile *Nodipecten nodosus* L. cultivados no litoral do Estado do Rio de Janeiro?

What is the risk of mercury contamination during consumption of farmed mussel *Perna perna* L. and farmed coquile *Nodipecten nodosus* L. from Rio de Janeiro State?

Longo, R.T.L.; Galvão, P.M.A.; Lino, A.S.; Torres, J.P.M.; Meire, R.O.; Pizzochero, A.C.; Botaro, D.; Malm, O.

Uma das vias de exposição humana ao Hg é o consumo de pescado dos ecossistemas marinhos. Uma vez que o alimento apresenta concentrações de Hg acima do limite determinado pela World Health Organization (0,5 ppm), pode representar um risco à saúde pública se a ingestão diária desse alimento for superior a 60 g/dia. Por outro lado, para se monitorar a dinâmica do Hg nos ecossistemas marinhos, a classe Bivalvia tem se apresentado com bons bio-monitores, que são utilizados como organismos sentinelas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o risco de exposição humana ao Hg total (HgT) pelo consumo de mexilhão *Perna perna* e coquile *Nodipecten nodosus* cultivados no litoral do Estado do Rio de Janeiro. Área de estudo: Baía de Guanabara (BG - Praia de Jurujuba), Baía de Sepetiba (BS - Praia Grande na Ilha de Itacuruça), Baía de Ilha Grande (BIG - Enseada da Biscaia em Monsuaba) e Arraial do Cabo (AC - Praia do Forno). Os mexilhões foram coletados nos quatro locais estudados e os coquiles na BIG e AC, ambos em março de 2009 e setembro de 2009. O HgT foi extraído do tecido dos bivalves seguindo-se a metodologia sugerida por Kehrig em 2001, e as concentrações determinadas por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (FIMS-400). Junto ao procedimento de extração e determinação da concentração das amostras, foi utilizado material certificado de referência (NIST2976). Foram observadas

diferenças nas concentrações de HgT entre os quatro locais estudados. Nos mexilhões, as maiores concentrações ocorreram na BIG, seguido de BG, AC e BS. Nos coquiles, a BIG apresentou maiores concentrações que AC. Kehrig analisou mexilhões da BG em 1996, 1998 e 2000 e observou um decréscimo das concentrações no decorrer dos anos. Neste estudo, os mexilhões da BG têm concentrações inferiores às observadas por Kehrig, corroborando com a hipótese de tendência de decréscimo. O limite de ingestão semanal para metilmercúrio por kg de peso corpóreo em populações críticas, como mulheres em idade reprodutiva e crianças, é de 1,6 µg. Assumindo as maiores concentrações encontradas para mexilhão expressas em peso úmido de 21,4 µg/kg e de 16,7 µg/kg para coquile, e considerando que 60% do mercúrio total bioacumulado no tecido do mexilhão está na forma de metilmercúrio, uma pessoa de 50 kg que ingerisse 39 mexilhões, ou então 37 coquiles por dia, atingiria apenas 1/6 do limite semanal admissível, admitindo apenas essa fonte de incorporação de hg. A conclusão foi que os mexilhões e coquiles dos quatro locais estudados estavam com concentrações de Hg seguras para consumo humano.

Agradecimentos: Projeto CNPq/Mapa/SDA 577906/2008-9 Edital 64.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica "Carlos Chagas Filho", Laboratório de Radioisótopos "Eduardo Penna Franca"
Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: renan89_lp@hotmail.com

Determinação do hormônio 17-alfa-metiltestosterona em amostras de peixe

Determination of the hormone 17-alfa-methyltestosterone in fish samples

Silva, V.A.G. da¹; Amorim, F.S.¹; Pereira, E.F.¹; Souza, J.R. de¹; Louvandini, H.²

O hormônio sintético 17-alfa-metiltestosterona (MT) é um anabólico esteroide derivado da testosterona, utilizado em humanos em casos de deficiência andrógena, infertilidade e câncer de mama. É aplicado também na piscicultura como promotor de populações monossexo de peixes, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). Com o aumento do consumo de peixes, o setor agroindustrial vem ampliando sua oferta, fornecendo uma maior variedade de espécies ao consumidor e demandando dos produtores uma crescente qualidade dos produtos fornecidos. Com isso, torna-se fundamental a garantia da inocuidade dos alimentos ofertados para consumo quanto à presença de resíduos decorrentes de drogas veterinárias, agroquímicos e, mais recentemente, hormônios. A importância do presente trabalho, reside principalmente na vulnerabilidade de crianças à exposição a produtos tóxicos, que em poucos anos pode representar alterações endócrinas em toda uma população, resultando em pessoas com amadurecimento genital precoce, feminização ou mesmo infertilidade. O presente trabalho teve como objetivo a otimização da aplicação da extração em fase sólida (SPE) em conjunto com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta visível (HPLC-UVVis), para a determinação do hormônio 17-alfa-metiltestosterona em amostras de peixe. O sistema LC utilizado foi acoplado a um detector. Extratos de MT foram analisados com as condições isocráticas: fase móvel, MeOH/Água (80/20, v/v), vazão de 0,4 mL/min tempo de corrida de 15 min e coluna C18 (150 mm x 4,6 mm e 4 mm x 2 mm; 4 µm) com detecção no comprimento de onda 236 nm. O volume de injeção foi de 20 µL. Para a extração em fase sólida foram utilizados cartuchos C18, utilizando-se como solvente para condicionamento do

adsorvente metanol/água, e metanol para a eluição do analito no final. Quanto às amostras, foram utilizados dois tipos de peixe: controle, na qual o peixe não sofreu exposição ao hormônio; e uma outra amostra, que passou pelo processo de reversão sexual. Foram feitos testes de recuperação em dois níveis de fortificação, empregando-se 1,0 g de peixe. As técnicas utilizadas apresentaram bons resultados. Os limites de detecção e quantificação variaram de 0,04 a 0,06 mg/kg e 0,07 a 0,21 mg/kg, respectivamente. A linearidade foi de 0,9992. A recuperação do método de extração variou entre 75-90%. Com relação às amostras utilizadas, não foram detectados resíduos do hormônio 17-alfa-metiltestosterona em nenhum dos dois tipos. Conclui-se que os resultados obtidos mostraram que o presente método cromatográfico tem aplicabilidade para o controle de qualidade de alimentos.

¹Universidade de Brasília, Instituto de Química, CP 04478, CEP 70904-970, Brasília, DF, Brasil.

E-mail: fabiullamorim@gmail.com

²Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, Brasil.

A importância do conhecimento do estado sanitário dos organismos aquáticos em pisciculturas da região noroeste paulista*

The importance of knowing the sanitary status of aquatic organisms in fish farmings on the Northwestern region of São Paulo State

Andreoli, T.B.^{1**}; Gozi, K.S.^{1**}; Franceschini, L.³; Garcia, F.²; Onaka, E.M.²; Romera, M.D.¹; Schalch, S.H.¹; Silva, R.J.³; Zago, A.C.³

O Estado de São Paulo possui enorme potencial para a piscicultura, pela abundância de água nos reservatórios de hidrelétricas e pelo clima favorável ao desenvolvimento dos peixes tropicais. O conhecimento do estado sanitário das pisciculturas torna-se imprescindível para o controle do transporte de peixes portadores de agentes patogênicos. Os processos de quarentena nas criações, da minimização do estresse e da preocupação com a qualidade do ambiente devem ser cada vez mais aprimorados. A ação governamental organizada se faz necessária, unindo esforços para que novas tecnologias, capacitação de recursos humanos e políticas menos restritivas sejam criadas. A Instrução Normativa do Mapa nº 53/2003, que estabelece o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA), tem o objetivo de ordenar as ações de prevenção, controle ou erradicação de doenças dos animais aquáticos. O Laboratório de Enfermidades de Animais Aquáticos (Lenaq) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios do Estado de São Paulo (Apta) foi criado na região Noroeste Paulista pela carência de laboratórios capacitados para diagnosticar as enfermidades de organismos aquáticos. Seu objetivo é o futuro credenciamento como laboratório oficial do PNSAA. Atualmente, o Lenaq procura estabelecer uma rede de ações, envolvendo pesquisadores da Apta, técnicos da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (Cati) e da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), órgãos pertencentes à Secretaria de Agricultura e Abastecimento. São realizadas a identificação de problemas sanitários nas unidades produtivas e análises de materiais laboratoriais, juntamente com uma anamnese e caracterização do cenário observado na propriedade. Análises histopatológicas e identificação de parasitos contaram com a colaboração da Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Jaboticabal e Botucatu, SP. Apesar do grande potencial para piscicultura, a região Noroeste Paulista possui um déficit em estudos sobre o estado sanitário da produção de organismos

aquáticos. Tais estudos são necessários para o desenvolvimento de qualidade e até mesmo para o melhoramento da produção. Até o presente momento, o Lenaq gerou 17 resumos publicados em cinco diferentes eventos científicos, além de duas dissertações de mestrado. Os resultados também tem sido divulgados em palestras e cursos destinados aos piscicultores e técnicos.

*CNPQ Processo nº 577649/2008-6 (Edital CNPq/Mapa/SDA 064/2008 - Linha 4 - Centros Colaboradores em Defesa Agropecuária).

**Bolsista Técnica CNPq.

¹Polo Regional do Noroeste Paulista, CP 61, CEP 15500-970, Votuporanga, SP, Brasil.

E-mail: tainá_ba@hotmail.com

²Instituto de Pesca, São José do Rio Preto, SP, Brasil. ³Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.

Avaliação do risco de intoxicação humana por Zn, Cu, Mn, Fe pelo consumo de mexilhões de cultivo comercial no estado do Rio de Janeiro

Risk assessment of human contamination by Zn, Cu, Mn, Fe through consumption of farmed mussels from Rio de Janeiro State, Brazil

Lino, A. S.; Galvão, P. M. A.; Longo, R. T. L.; Torres, J. P. M.; Meire, R. O.; Pizzochero, A. C.; Botaro, D.; Malm, O.

Os efluentes domésticos, de indústrias ou de minerações são as principais fontes de metais pesados para os ecossistemas aquáticos, estando principalmente associados ao material particulado em suspensão. Os moluscos bivalves, por serem sedentários e apresentarem hábito alimentar filtrador, se mostram como um bom biomonitor, podendo acumular metais em seus tecidos. A maricultura de mexilhões é o cultivo desses organismos nos seus habitats naturais, geralmente com objetivos comerciais vem crescendo a uma taxa muito elevada. O consumo humano de bivalves com concentrações de metais acima do limite determinado pela World Health Organization (WHO) pode causar danos à saúde pública. Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Ferro (Fe), apesar de desempenharem funções biológicas, quando ingeridos em altas concentrações, causam sérios riscos à biota e ao homem, podendo, em certos casos, provocar a morte. No Estado do Rio de Janeiro (RJ), o mexilhão *Perna perna* L. é cultivado na Baía de Sepetiba (BS), Baía de Ilha Grande (BIG), Baía de Guanabara (BG) e Arraial do Cabo (AC), possibilitando, assim, um estudo de monitoração que abrange diferentes regiões do RJ. Com o objetivo de verificar se os mexilhões *P. perna* L. cultivados na BS, AC, BG e BIG estavam com concentrações de Zn, Cu, Mn e Fe abaixo do máximo permitido pela WHO para o consumo humano, foram coletados os bivalves dos locais citados acima no final das estações de verão e inverno de 2009. Os metais foram extraídos do tecido dos bivalves adicionando-se uma mistura ácida de HNO₃ + HCl (3:1) e as concentrações determinadas por espectrometria de absorção atômica por chama (AA240FS-Varian) sendo expressas em função do peso úmido (µg/g). Junto ao procedimento de extração e determinação da concentração dos metais nas amostras foi concomitantemente utilizado material certificado de referência (NIST-2976) para fins de controle de qualidade. As concentrações de Zn, Cu, Mn e Fe verificadas nos mexilhões estavam abaixo do limite de ingestão determinado pela WHO (Zn = 300 µg/kg/dia; Cu = 10 µg/kg/dia; Mn = 60 µg/kg/dia e Fe = 800 µg/kg/dia). Assumindo-se as maiores concentrações de metais encontradas nos mexilhões e considerando-se a massa úmida deles

igual a 6g, as cargas encontradas foram: Zn = 83 µg; Cu = 2 µg; Mn = 41 µg e Fe = 768 µg. Portanto, uma pessoa de 70 kg poderia consumir até 72 mexilhões por dia sem riscos, considerando-se apenas a contaminação por esses metais.

Agradecimentos: Projeto CNPq/Mapa/SDA 577906/2008-9 Edital 64.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica "Carlos Chagas Filho", Laboratório de Radioisótopos "Eduardo Penna Franca"
Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: adan_lino@hotmail.com

Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* para produção de insumos com valor diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose

Characterization of antigenic composition of Neospora caninum for the production of diagnostic kits and vaccine protocols

Macêdo-Júnior, A.G.; Santiago, F.M.; Silva, M.V.; Ferreira, F.B.; Cunha-Junior, J.P.; Silva, D.A.O.; Mineo, T.W.P.; Mineo, J.R.

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa, filogeneticamente relacionado ao *Toxoplasma gondii*. Relacionado a abortamento bovino desde a década de 90, tem despertado interesse crescente de pesquisadores do mundo todo. A julgar pelo fato que o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, considera-se que o impacto dessa parasitose sobre a cadeia de produção de carne e leite nacionais apresenta importante magnitude. Vários tipos de vacinas contra *N. caninum* têm sido avaliadas, contudo a proteção conferida é parcial e dependente dos adjuvantes utilizados. O diagnóstico laboratorial da neosporose é classicamente realizado com o teste de imunofluorescência indireto, que apresenta limitações como a interpretação subjetiva do observador. Objetivando avaliar o perfil de reconhecimento antigênico em bovinos com infecção por *N. caninum*, amostras de soro foram avaliadas por Western blot (WB). Após o tratamento das amostras sorológicas com 6M de ureia a banda de 42 kDa passou a não ser reconhecida em soros de fase aguda, indicando ser um possível marcador de infecção recente da neosporose. Quando realizada análise com amostras de fase crônica da doença, houve o surgimento de proteínas de baixo peso molecular, variando entre 23-29 kDa, reconhecidas por anticorpos de alta avidéz. Esses dados podem indicar que proteínas de baixo peso molecular possuem potencial para serem utilizadas na produção de insumos como marcadores de fase crônica da doença de neosporose. Para avaliar o perfil sorológico de reação cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii*, o soro de animais infectados com ambos os parasitos foi submetido a WB contendo antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA), a antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), a antígeno secretado/excretado de *T. gondii* (ESA) e a STAg sem a presença de antígeno secretado/excretado de *T. gondii* (STAg-ESA). Por ELISA, pode ser observado que soros de animais infectados com *N. caninum* não apresentaram reatividade cruzada com ESA (IE < 1,0), mas todos os animais apresentaram IE > 1,2 quando submetidos à reação com STAg-ESA. Por WB, as mesmas amostras de soro não reconheceram proteínas de baixo peso molecular de STAg, apresentando reatividade cruzada com bandas de 80, 53, 46 e 42 kDa. Ainda avaliando-se reatividade cruzada desses animais, foram constatadas reação cruzada com proteínas de 82 kDa de ESA e 82 e 75 kDa de STAg-ESA. Assim, o presente projeto apontou alvos proteicos para a confecção de ensaios específicos para o diagnóstico, bem como protocolos seguros e eficientes de vacinação contra a neosporose bovina.

Apoio: Mapa/SDE/CNPq, Capes, Fapemig.

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Laboratório de Imunoparasitologia "Mario Endsfeldz Camargo"
Av. Pará, 1720, CEP 38402-030, Uberlândia, MG, Brasil.
E-mail: jrmineo@ufu.br

Aumento da competência científica e tecnológica no controle da *Neospora caninum* em bovinos na defesa agropecuária nacional*

Increase of scientific and technology competence to control *Neospora caninum* in cattle for agricultural national defense

Pereira, G. R.¹; Bohrer, R. C.¹; Nóbrega Junior, J. E.¹; Andrade Neto, O. A. S.¹; Rigo, M.¹; Rissi, V. B.¹; Toscan, G.²; Vogel, F. S. F.²; Oliveira, J. F. C.¹; Gonçalves, P. B. D.¹

A neosporose é uma enfermidade parasitária considerada como uma das principais doenças reprodutivas em animais domésticos de produção em todo o mundo. Grande parte das infecções em bovinos é originária da transmissão vertical. Sendo assim, os principais objetivos deste estudo foram: determinar a patogenia da infecção transplacentária em fêmeas bovinas inoculadas com *N. caninum*; padronizar as técnicas de extração de DNA do *N. caninum* utilizando-se diferentes tecidos obtidos de modelos experimentais; e implementar a técnica de qPCR para diagnóstico de neosporose e determinar a presença de *N. caninum* nas diferentes áreas do sistema nervoso e nos diferentes órgãos de fetos bovinos. Camundongos foram submetidos à inoculação de *N. caninum* e sacrificados para coleta de segmentos do sistema nervoso central para padronização das técnicas de detecção por PCR convencional. Para a obtenção do antígeno, taquizoítos da cepa NC-1 do *N. caninum* foram inoculados em cultivo de células Vero para multiplicação até alcançar um título aproximado de 1×10^7 taquizoítos/mL. Trinta vacas soronegativas ao protozoário foram alocadas em diferentes grupos: G1 (n = 9) inoculação com *N. caninum* e após 60 dias foram submetidos ao protocolo de IATF (60d + IATF); G2 (n = 11) inoculação com *N. caninum* 60 dias após a IATF (IATF + 60d); e G3 (n = 9) soronegativas para *N. caninum* submetidos a IATF (controle). Os animais foram monitorados por ultrassonografia 35 dias após IATF até a interrupção da gestação por cesárea aos 170 dias para a realização das análises do tecido fetal. As amostras fetais foram submetidas à extração de DNA para avaliação quantitativa da presença do *N. caninum* por qPCR com a utilização de uma sonda TaqMan desenhada a partir da sequência do gene Nc5 (GenBank: X84238). Como controle, foi utilizada a detecção através de PCR convencional, amostras de taquizoítos cultivados *in vitro* e IPC para a reação de presença/ausência pela técnica de TaqMan. As taxas de prenhez aos 35 dias dos animais previamente inoculados 60d + IATF (4/9; 44,4%) foram maiores do que no grupo-controle (8/9; 88,8%) ($P < 0,05$). Aos 60 dias, o grupo 60d + IATF (0/4; 0%) mostrou-se diferente quando comparado aos grupos IATF + 60d (5/7; 71,4%) e controle (6/8; 75,0%) ($P < 0,05$). Com a TaqMan foi observada a presença do DNA de *N. caninum* no bulbo olfatório e córtex posterior direito de 3/5 fetos provenientes do grupo inoculado após a IATF. Com esses resultados ficou demonstrado que a técnica de qPCR mostrou-se capaz de detectar o DNA do protozoário no SNC fetal. Conclui-se que houve infecção transplacentária nos animais inoculados após a IATF e que o protozoário *N. caninum* interferiu negativamente na gestação dos animais inoculados.

*Capes, CNPq.

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.
E-mail: gabrielrp@biorep.ufsm.br

²Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Parasitárias, Santa Maria, RS, Brasil.

Detecção de anticorpos anti *Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta*

Detection of antibodies against *Neospora caninum* in individual and bulk milk samples from cattle by the technique of indirect immunofluorescence assay

Camillo, G.¹; Pereira, G. R.²; Cezar, A. S.¹; Antonello, A. M.¹; Sangioni, L. A.¹; Flores, E. F.¹; Rosa, P. R. A.²; Muller, L.³; Gonçalves, P. B. D.²; Vogel, F. S. F.¹

Neospora caninum é um agente envolvido em perdas reprodutivas em bovinos. Essas manifestações induzidas pelo parasito causam relevantes prejuízos aos rebanhos de corte e leite. O diagnóstico dessa infecção é de grande importância, principalmente para programas de erradicação e controle. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: adaptar uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite, a partir de uma RIFI padronizada para a detecção desses anticorpos no soro sanguíneo; analisar a concordância entre a detecção desses anticorpos pela RIFI no soro sanguíneo e no leite de fêmeas bovinas; e avaliar a viabilidade da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite. Foram testadas amostras de soro sanguíneo e de leite, coletadas de 112 vacas em lactação, e seis amostras coletivas de leite, correspondentes a cada uma das propriedades avaliadas localizadas na região central do Rio Grande do Sul. As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea e identificadas individualmente. As amostras de leite individuais foram coletadas de todos os animais em lactação, em tubos de ensaio estéreis. Em cada propriedade, foi coletada uma amostra coletiva de leite, 15 mL aproximadamente, do tanque refrigerado, o qual continha a totalidade do leite coletado das vacas avaliadas. A pesquisa de imunoglobulinas da classe G anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite foi efetuada pela RIFI. Encontrou-se 78% de concordância entre a detecção de anticorpos no soro sanguíneo (com título de anticorpos ≥ 50) e no leite, com sensibilidade de 90% e especificidade de 100% para a RIFI nas amostras de leite. Entretanto, para as vacas com títulos de anticorpos ≥ 100 no soro sanguíneo, tanto a concordância como os valores de sensibilidade e especificidade da RIFI no leite foram de 100%. Todas as amostras coletivas de leite foram positivas na RIFI. Isso demonstra que, conforme a propriedade, pode-se eleger com segurança qual a melhor abordagem diagnóstica a ser adotada em relação à coleta de soro sanguíneo ou de leite para a pesquisa de *N. caninum* pela RIFI. Além disso, a determinação da presença de anticorpos em amostras coletivas de leite pode servir para diagnóstico e triagem de rebanhos com animais infectados.

*Capes, CNPq.

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Parasitárias Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

E-mail: giovanacamillo@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Santa Maria, RS, Brasil. ³Cosulati, Departamento Técnico, Pelotas, RS, Brasil.

O efeito da adubação com ureia em sistema rotacionado de pastagem no controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)

The effect of urea fertilization in rotational grazing system to control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini: 1888) (Acari: Ixodidae)

Wanderley, R.P.B.^{1**}; Ribeiro, A.C.C.L.²; Rodrigues, D.S.³; Cunha, A.P.¹; Bello, A.C.P.P.^{1*}; Barros, A.B.¹; Leite, L.B.¹; Resende, T.P.^{1***}; Leite, P.V.B.¹; Domingues, L.N.¹; Oliveira, P.R.¹; Leite, R.C.¹

O controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem sido largamente realizado com carrapaticidas sintéticos e tem-se buscado alternativas de defensivos contra esse parasito. Neste estudo, foi avaliado o efeito da adubação de pastagens com ureia na infestação por *R. (B.) microplus* em bovinos leiteiros e na quantidade de tratamentos utilizados para seu controle. O estudo foi desenvolvido no período de abril/2009 a abril/2010, utilizando-se 20 vacas mestiças, mantidas em pastejo rotacionado, na Embrapa Gado de Leite, MG. Os animais foram divididos equitativamente em dois grupos experimentais e mantidos separados em duas áreas de piquetes adubados com e sem ureia. Utilizaram-se 25 piquetes de 400 m² para cada grupo e cada piquete foi pastejado por 24 horas. Os piquetes do grupo tratado, após a saída diária dos animais, recebiam 4,6 kg de ureia. O controle dos carrapatos foi realizado com carrapaticidas aplicados por aspersão, quando constatada a presença de partenóginas (fêmea ± 3 mm). As cargas parasitárias dos grupos foram avaliadas 14 e 21 dias após os tratamentos carrapaticidas. Os dados coletados foram divididos em quatro subgrupos para que fossem analisados por período: grupo 1 - animais dos piquetes tratados com ureia no período das águas (T1S1); grupo 2 - animais dos piquetes não adubados, no período das águas (ToS1); grupo 3 - animais dos piquetes tratados no período da seca (T1So); e grupo 4 - animais dos piquetes não adubados, no período da seca (ToSo). Os resultados da carga parasitária (mediana ± desvio-padrão) por grupo foram: T1S1: 120,00 ± 384,12 ToS1: 160,00 ± 989,40; T1So: 86,00 ± 673,57; ToSo: 148,00 ± 721,43. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens medianas dos carrapatos dos grupos 1, 2 e 3. O resultado do grupo 4 foi igual ao dos grupos 1 e 2. Esses resultados indicaram que a maior umidade no período das águas atuou na redução da infestação, provavelmente devido ao aumento da hidrólise da ureia, portanto da ação tóxica da amônia (NH₃) sobre as teleóginas em vida livre. O número de tratamentos para o controle estratégico dos carrapatos foi igual nos dois grupos, porém o grupo controle recebeu três tratamentos táticos durante o período, quando a infestação foi superior a 20 teleóginas e/ou quando a infestação por ninfas foi muito alta. Foi possível inferir que o manejo adotado e a adubação com ureia reduziram a infestação e o número de tratamentos do grupo tratado. As observações continuam e são esperadas maiores diferenças nos ciclos seguintes.

*Bolsista DTI-3

**Bolsista DTI-3

***Bolsista ITI-A

Auxílio financeiro: CNPq.

Apoio: CNPq; INCT Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: rebyvet@gmail.com

²Embrapa Gado de Leite, Campo Experimental de Coronel Pacheco, Coronel

Pacheco, MG, Brasil. ³Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais,

Unidade Regional do Centro-Oeste de Minas Gerais, Fazenda Experimental

Santa Rita, Prudente de Moraes, MG, Brasil.

Efeito da adubação com ureia no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Effect of urea on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Cunha, A. P.¹; Bello, A. C. P. P.^{1**}; Domingues, L. N.¹; Leite, P. V. B.¹; Rodrigues, D. S.³; Wanderley, R. P. B.^{1*}; Barros, A. B.¹; Resende, T. P.^{1***}; Leite, L. B.¹; Ribeiro, A. C. C. L.²; Oliveira, P. R.¹; Leite, R. C.

Objetivou-se verificar o efeito da adubação com ureia sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, em sistema intensivo de produção de leite a pasto, com capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon). O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, Igarapé, MG, de janeiro de 2010 a junho de 2011. As vacas em lactação, média de 80 animais de raça holandesa e mestiços holando/zebu, foram divididas em dois grupos: controle, mantido em sistema convencional de pastejo, e grupo tratado mantido em sistema intensivo com ocupação de um dia e adubação de cobertura com ureia. A área destinada ao grupo tratado era de 4 ha e dividida em 32 piquetes de 1.250 m². A lotação foi regulada de acordo com a oferta de forragem e do resíduo pós-pastejo. Procedeu-se a análise e correção do solo em ambas as áreas e a adubação com ureia foi realizada diariamente após a saída dos animais, nos períodos de janeiro a abril de 2010 e de outubro de 2010 a maio de 2011, na dosagem de 20 kg de ureia/piquete/dia. Para todas as categorias de bovinos da propriedade esquematizou-se controle estratégico contra *R. (B.) microplus*, de abril a julho de cada ano, com intervalo entre tratamentos determinado pela presença de fêmea semi-ingurgitada do carrapato de tamanho ≥ 3 mm parasitando os animais. Mediante teste de suscetibilidade empregou-se a associação cipermetrina + clorpirifós + butóxido de piperonila na forma de banhos carrapaticidas. As contagens foram realizadas mensalmente, considerando-se as fêmeas ≥ 3 mm parasitando o antímero direito dos animais, multiplicado por 2. Os resultados globais das contagens definiram uma média de 28, 14 fêmeas de *R. (B.) microplus* ≥ 3 mm nas vacas do grupo controle e 6,66 nas vacas mantidas nas pastagens adubadas com ureia ($P < 0,001$). A lotação no grupo tratado atingiu o pico de 15 vacas/ha em fevereiro de 2011. Os animais do grupo controle receberam 19 tratamentos carrapaticidas ao longo do ano de 2010 e os animais do grupo tratado, 14 banhos. Nos seis primeiros meses de 2011 o grupo controle recebeu oito tratamentos carrapaticidas e o grupo tratado, sete aplicações. A lotação no grupo tratado atingiu o pico de 15 vacas/ha em fevereiro de 2011. Os resultados obtidos indicaram o efeito da ureia sobre a população de *R. (B.) microplus* e também demonstraram que a estratégia de tratamento mediante a presença de fêmea ≥ 3 mm reduz a necessidade de banhos, racionalizando o uso de carrapaticidas e, conseqüentemente, o risco de resíduos no leite e a pressão de seleção de carrapatos resistentes.

*Bolsista DTI-3; **Bolsista DTI-3; Bolsista ITI-A.

Apoio: CNPq e INCT Informação Genético-sanitária da Pecuária Brasileira.

Auxílio financeiro: CNPq.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: arildo.pcinha@gmail.com

²Embrapa Gado de Leite, Campo Experimental de Coronel Pacheco, Coronel

Pacheco, MG, Brasil. ³Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais,

Unidade Regional do Centro-Oeste de Minas Gerais, Fazenda Experimental

Santa Rita, Prudente de Morais, MG, Brasil.

Controle estratégico integrado de endo e ectoparasitos em rebanhos comerciais da bacia leiteira de Sete Lagoas, MG

Strategic control of parasites in commercial dairy herds of Sete Lagoas Basin, MG, Brazil

Barros, A. B.¹; Rodrigues, D. S.²; Wanderley, R. P. B.^{1***}; Cunha, A. P.¹; Bello, A. C. P.^{1*}; Leite, L. B.¹; Resende, T. P.^{1***}; Leite, P. V. B.¹; Domingues, L. N.¹; Oliveira, P. R.¹; Leite, R. C.¹

O controle de parasitos é um fator importante da cadeia de produção do leite. A comercialização de endo e ectoparasitoides representou, em 2009, 34% do mercado brasileiro de produtos veterinários. Além disso, os parasitos provocam queda da produtividade, transmitem patógenos e causam morte dos animais, gerando perdas econômicas ainda maiores. O carrapato dos bovinos é um dos problemas sanitários que mais afetam os rebanhos. Atualmente, seu controle é realizado com a utilização de carrapaticidas, em geral mal aplicados. A falta de conhecimento dos produtores acerca das práticas efetivas de controle e o uso inadequado de equipamentos e produtos são causas frequentes de erros na aplicação de carrapaticidas em propriedades produtoras de leite. Com os objetivos de implantar e avaliar uma proposta de controle estratégico em propriedades particulares, verificar pontos de estrangulamento da proposta em situação real e a apropriação pelos produtores das práticas de controle, foram construídos sistemas de contenção e pulverização de animais em quatro propriedades da bacia leiteira de Sete Lagoas. Durante o período de um ano, foi efetuado o acompanhamento dos tratamentos parasitoides realizados pelos produtores e para a avaliação da carga parasitária dos animais. Foram realizadas contagens quinzenais de partenóginas em 20% das vacas em lactação e exames mensais de OPG nos bezerras e bezerras lactentes. Fichas de anotações zootécnicas e sanitárias e de dados climáticos foram fornecidas aos produtores para registro dos dados. Um questionário foi aplicado no início do projeto para a elaboração de um perfil socioeconômico dos proprietários, bem como para avaliação do entendimento inicial dos mesmos quanto ao controle e biologia dos principais problemas parasitários das suas fazendas. A avaliação qualitativa dos dados indicou que o perfil das propriedades estudadas foi representativo do sistema produtivo na região. Sobre o controle parasitário nas propriedades estudadas, os resultados obtidos até o presente demonstraram que, na propriedade em que os tratamentos estratégicos foram seguidos de acordo com a recomendação proposta, as contagens de partenóginas, a avaliação de OPG e a quantidade de tratamentos foram menores que naquelas em que a recomendação de controle estratégico não foi realizada. Fatores como

problemas de saúde dos produtores, necessidade de participação em reuniões, interferência de outros atores sociais no sistema de controle de parasitos, o desconhecimento da biologia dos parasitos, bem como a adoção de algumas práticas consideradas inadequadas, uso de produtos não recomendados para o controle de parasitos em vacas leiteiras, banhos inadequados e com carrapaticidas não recomendados interferiram negativamente no controle estratégico integrado de endo e ectoparasitas nas propriedades estudadas.

*Bolsista DTI-3; **Bolsista DTI-3; ***Bolsista ITI-A; Auxílio financeiro: CNPq.

Apoio: CNPq; INCT Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: vetandersonbarbieri@yahoo.com.br

²Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional do

Centro-Oeste de Minas Gerais, Fazenda Experimental Santa Rita, Prudente de

Morais, MG, Brasil.

Consumo de solução carrapaticida em bovinos, utilizando-se diferentes equipamentos para pulverização

Consumption of bovine acaricide using different spraying equipments

Rodrigues, D. S.¹; Wanderley, R. P. B.^{2***}; Bastianetto, E.²; Cunha, A. P.²; Bello, A. C. P.^{2*}; Barros, A. B.²; Leite, P. V. B.²; Domingues, L. N.²; Silva, M. X.²; Oliveira, P. R.²; Leite, R. C.²

A principal alternativa disponível para o controle do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ainda é o controle químico. Embora existam muitos estudos visando o desenvolvimento tecnologias de controle que evitem a utilização de acaricidas, isso ainda não é possível e não há perspectiva de que possa acontecer em curto prazo. Apesar dos carrapaticidas serem largamente utilizados, não existem estudos científicos no Brasil avaliando os equipamentos empregados para pulverização. Geralmente, os equipamentos utilizados são adaptações de máquinas para uso agrícola. Com o objetivo de avaliar o consumo de solução carrapaticida de quatro equipamentos para pulverização, foi implantado um experimento na Fazenda Experimental Santa Rita da Epamig, utilizando um rebanho leiteiro $\frac{3}{4}$ holandês x zebu, dividido em quatro grupos de 20 animais: T₁, T₂, T₃ e T₄. Cada grupo foi mantido em áreas de pastagem e praças de alimentação independentes durante todo o período experimental. Foram avaliados os equipamentos: adaptação de pulverizador agrícola utilizado em tratores (T₁), bomba costal (T₂), câmara atomizadora (T₃) e “brete de pulverização” (T₄). Foram realizados oito banhos carrapaticidas durante o período de quatro meses, em intervalos de 15 dias. Os valores médios e desvios-padrão, expressos em litros/animal, por grupo foram: 2,08 ± 0,34, 3,12 ± 0,42, 3,67 ± 0,13, 3,13 ± 0,26 para T₁, T₂, T₃ e T₄, respectivamente. Foi utilizado o teste t de Student para a comparação dos resultados e não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. Os resultados obtidos, nas condições empregadas, indicaram que a quantidade de solução carrapaticida utilizada em pulverizações de bovinos não depende do tipo de equipamento de pulverização utilizado.

*Bolsista DTI-3.

**Bolsista DTI-3

Auxílio financeiro: CNPq.

Apoio: CNPq; INCT Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira

¹Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Unidade Regional do Centro-Oeste de Minas Gerais, Fazenda Experimental Santa Rita
Rod. MG 424, km 64, CEP 35715-000, Prudente de Morais, MG, Brasil.
E-mail: dsrodrigues@epamig.br

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Tempo de duração do banho carrapaticida em bovinos, utilizando-se diferentes equipamentos para pulverização

Length of bovine acaricide spray treatment using different equipments

Rodrigues, D. S.¹; Wanderley, R. P. B.^{2**}; Bastianetto, E.²; Cunha, A. P.²; Bello, A. C. P.^{2*}; Barros, A. B.²; Leite, P. V. B.²; Domingues, L. N.²; Silva, M. X.²; Oliveira, P. R.²; Leite, R. C.²

A principal alternativa disponível para o controle do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ainda é o controle químico. Embora existam muitos estudos visando o desenvolvimento de tecnologias de controle que evitem a utilização de acaricidas, isso ainda não é possível e não há perspectiva de que possa acontecer em curto prazo. Apesar dos produtos carrapaticidas serem largamente utilizados, não existem estudos científicos no Brasil avaliando os equipamentos empregados para pulverização. Geralmente, os equipamentos utilizados são adaptações de máquinas destinadas ao uso agrícola. Com o objetivo de avaliar o tempo de duração do banho carrapaticida de três equipamentos para pulverização, foi implantado um experimento na Fazenda Experimental Santa Rita da Epamig, que utilizou vacas $\frac{3}{4}$ holandês x zebu, divididas em três grupos de, aproximadamente, 20 animais: T₂, T₃ e T₄. Cada grupo foi mantido em áreas de pastagem e praças de alimentação independentes durante todo o período experimental. Foram avaliados os equipamentos: bomba costal (T₂), câmara atomizadora (T₃) e “brete de pulverização” (T₄). Foram realizados oito banhos carrapaticidas durante o período de quatro meses, em intervalos de 15 dias. Os valores médios e desvios-padrão, expressos em minutos/animal, para cada grupo foram: $4,42 \pm 0,74$, $0,15 \pm 0,10$, $1,38 \pm 0,14$ para T₂, T₃ e T₄, respectivamente. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação dos dados e foi observada diferença estatística entre os três tratamentos avaliados ($p < 0,05$). Os resultados obtidos nas condições propostas indicaram que o tempo de duração do banho carrapaticida depende do equipamento empregado para pulverização. É importante ressaltar que a redução do tempo de banho diminui o custo operacional do conjunto de medidas de controle, o que é desejável, desde que não ocorra redução da qualidade dos banhos.

*Bolsista DTI-3.

**Bolsista DTI-3

Auxílio financeiro: CNPq.

Apoio: CNPq; INCT Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira.

¹Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional do Centro-Oeste de Minas Gerais, Fazenda Experimental Santa Rita, Rod. MG 424, km 64, CEP 35715-000, Prudente de Morais, MG, Brasil.
E-mail: dsrodrigues@epamig.br

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Dinâmica das infestações pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos tratados com lactona macrocíclica no Rio Grande do Sul*

Dynamic of the infestations by Rhipicephalus (Boophilus) microplus in cattle treated with macrocyclic lactone in Rio Grande do Sul, Brazil

Martins, J. R.¹; Reck, J.¹; Doyle, R. L.¹; Vieira, A. W.²; Termignoni, C.²; Silva Vaz Junior, I. da²

O efeito da aplicação de ivermectina sobre a dinâmica populacional do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi avaliado em animais naturalmente infestados no período de agosto de 2009 a janeiro de 2010. O experimento foi realizado com 40 bovinos (*Bos taurus*) mantidos em condições de campo no município de São Gabriel, RS. Quatro tratamentos foram realizados, os dois primeiros foram baseados em informação epidemiológica e controle estratégico (tratamento prévio ao reinício, das infestações). Um grupo controle foi mantido sem tratamento carrapaticida. Foram realizadas contagens de carrapatos adultos (tamanho $\geq 4,5$ mm) a cada duas semanas. Até o início do mês de dezembro (início do verão) a população de carrapatos em ambos os grupos foi inferior a 20 carrapatos por bovino. Nos bovinos tratados, houve um controle satisfatório da população de carrapatos até a primeira metade de novembro, na qual a população média de carrapatos por animal superou a 20 carrapatos. Nessa ocasião foi realizado um 3º tratamento e após 14 e 28 dias foi observada uma quantidade significativa de carrapatos nos animais tratados, oito e 16 carrapatos por bovino, respectivamente. A 3ª aplicação permitiu sobrevivência de carrapatos, possibilitando a reinfestação dos pastos, constatada em janeiro onde as populações de *R. microplus* aumentaram consideravelmente. Aos 28 dias do 3º tratamento, os animais foram novamente tratados. Esta última aplicação de ivermectina não permitiu a remoção completa dos carrapatos, apesar de ter reduzido significativamente a média de carrapatos duas semanas após o tratamento (dois por bovino). Ao final, devido à excessiva população de carrapatos nos controles, houve a necessidade de tratamento nesse grupo e o experimento foi encerrado. Com o início do período do verão, as contagens de carrapatos nos controles aumentaram significativamente e atingiram valores acima de 150 carrapatos por bovino. No grupo tratado, também foi observado um aumento nas contagens de carrapatos adultos em relação às semanas anteriores, atingindo 40 carrapatos por bovino aos 28 dias após o 4º tratamento. Apesar da carga parasitária dos animais tratados ter sido significativamente inferior aos controles durante todo o experimento, não foi possível a remoção completa dos parasitos e o bloqueio de reinfestações, mesmo poucos dias após o tratamento. Esse dado demonstra a dificuldade do uso exclusivo de lactonas macrocíclicas no controle de populações de carrapatos sob as condições testadas, particularmente em áreas de pastagens muito infestadas.

*CNPq/Mapa

¹Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Estrada do Conde, 6000. CEP 92990-000, Eldorado do Sul, RS.

E-mail: joaorsm@terra.com.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS.

Dynamic of the infestations by Rhipicephalus (Boophilus) microplus in cattle treated with macrocyclic lactone in Rio Grande do Sul, Brazil

Avaliação *in vitro* da sensibilidade a acaricidas de populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Rio Grande do Sul*

Evaluation of in vitro acaricide susceptibility of Rhipicephalus (boophilus) microplus populations in Rio Grande do Sul, Brazil

Martins, J. R.¹; Reck, J.¹; Doyle, R. L.¹; Gonzales, J. C.²; Vieira, A. W.²; Araújo, U. S.¹; Termignoni, C.²; Silva Vaz Junior, I. da²

O monitoramento da sensibilidade das populações de carrapatos aos carrapaticidas é um procedimento fundamental para o controle adequado desse ectoparasito. Nesse contexto, e considerando o avanço da resistência aos acaricidas, é preciso a identificação correta do carrapaticida a ser utilizado, sendo o Teste de Imersão de Adultos (TIA) o método preferencial de diagnóstico *in vitro*. Visando a avaliação da sensibilidade aos acaricidas, foram realizados TIA de amostras de distintas regiões do Rio Grande do Sul, durante o período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010. Foram testados produtos amidínicos, piretróides, associações acaricidas e fipronil. Considerou-se como população resistente quando a inibição de postura foi inferior a 85% pós-tratamento. A escolha dos produtos avaliados para cada amostra baseou-se no histórico de uso de produtos na propriedade e na disponibilidade de teleóginas para o teste. Foram testados seis produtos (A1 a A6) à base de amitraz 12,5% (amidínicos). Foram observadas populações resistentes a todos os produtos amidínicos, sendo: 35,6% de amostras resistentes ao acaricida A1 (73 testes); 37,5% ao A2 (48 testes); 37,8% ao A3 (37 testes); 66% ao A4 (203 testes); 60% ao A5 (20 testes); e 84,9% ao A6 (72 testes). Foram testados quatro produtos, três à base de cipermetrina 15% (C1, C2, C3) e um de deltametrina 5%. Registraram-se amostras resistentes a todos os produtos testados, sendo: 75% de amostras resistentes ao acaricida C1 (12 testes); 62% ao C2 (58 testes); 80,8% ao C3 (68 testes); e 90,4% das amostras resistentes à deltametrina (84 testes). Dentre os produtos à base de associações de piretróides (ou amidínicos) e organofosforados, foram testadas sete diferentes formulações (PO1 a PO7). Os resultados dos testes com associações foram 4,1% de amostras resistentes ao acaricida PO1 (cipermetrina, clorpirifós, piperonila - 146 testes); 6,5% ao PO2 (cipermetrina, clorpirifós - 170 testes); 16,7% ao PO3 (cipermetrina, diclorvos - 120 testes); 29,8% ao PO4 (cipermetrina, ethion - 114 testes); 10% ao PO5 (cipermetrina, clorpirifós - 10 testes); e nenhuma amostra apresentou resistência aos produtos PO6 (amitraz, clorpirifós - 8 testes) e PO7 (cipermetrina hi-cis, clorpirifós - 58 testes). Por fim, foi avaliada a resistência ao fipronil, evidenciando-se 26,2% de amostras resistentes (145 testes). Os resultados indicaram uma situação preocupante em relação aos produtos amidínicos e piretróides, onde a maioria das populações foi confirmada como resistente. Os dados reforçam a hipótese de incremento de resistência ao fipronil e que a maioria das populações pode ser controlada com associações carrapaticidas. O delineamento de estratégias de controle, que, na maioria dos casos, incluem os acaricidas químicos, precisa considerar a importância da avaliação *in vitro* para a escolha do produto adequado.

*CNPq/Mapa.

¹Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Fepagro Estrada do Conde, 6000. CEP 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brasil. E-mail: joaorsm@terra.com.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

Determinação e quantificação de avermectinas em leite por cromatografia a líquido de alta resolução com detecção por fluorescência

Determination and quantification of avermectins in milk using high performance liquid chromatography with fluorescence detection

Lagêdo, L. S.; Resende, M. F.; Lemos, M. A. T.; Pereira Netto, A. D.

Atualmente, a pecuária dispõe de diferentes medidas para coibir as infecções nos animais que se apoiam no emprego de fármacos com ação profilática ou terapêutica. Nas últimas décadas, o uso dos antiparasitários tem sido uma das alternativas de tratamento de maior eficácia e de uso frequente por parte dos produtores. As avermectinas (abamectina, ivermectina, doramectina e eprinomectina) são lactonas macrocíclicas com propriedades antiparasitárias e anti-helmínticas de amplo espectro, frente às formas adultas e imaturas de nematóides que podem permanecer no produto final na forma original ou como metabólitos. A possibilidade da presença de avermectinas (AVMs) no alimento representa um potencial risco à saúde do consumidor como, por exemplo, hipersensibilidade, alergias e resistência. O objetivo do presente trabalho foi implementar condições de quantificação de AVMs em leite UHT integral de diferentes marcas, adquiridos no comércio da Cidade de Niterói, RJ, Brasil. O método de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) foi empregado na extração das AVMs. Com essa finalidade, 8 mL de acetonitrila foram adicionados a 4 mL de leite. A suspensão obtida foi homogeneizada em vórtex e agitador orbital e, posteriormente, congelada a -18° C por 24 horas. Após esse período, era obtido um sistema bifásico constituído da fase sólida (congelamento da fase aquosa e da matriz) e de fase líquida (sobrenadante), obtendo-se um extrato praticamente isento de água, que foi desidratado com MgSO₄. As AVMs presentes no extrato eram posteriormente derivatizadas com 1-metilimidazol, trietilamina, anidrido trifluoracético e ácido trifluoracético em condições otimizadas. A análise e quantificação dos derivados foram realizadas por CLAE com detecção por fluorescência (excitação em 365 nm e emissão em 470 nm). Os parâmetros analíticos do método foram avaliados por curvas analíticas com concentrações dos quatro derivados na faixa de 0,500 a 8,00 µg/L, resultando em limites de quantificação de 0,100 a 0,400 µg/L e coeficientes de determinação iguais a 0,999 ou 1,00. A avaliação da recuperação dos analitos foi realizada com amostras fortificadas em três níveis (5,00 10,0 e 20,0 µg/L) e em triplicatas independentes, e valores entre 69 a 93% com coeficiente de variação < 10% foram obtidos. A aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de leite UHT integral adquiridas no mercado de varejo do Rio de Janeiro e Niterói indicou que as AVMs não foram encontradas nas amostras e que a concentração de Ivermectina era, portanto, menor que seu LMR. O método empregado apresentou boa produtividade, pois a etapa de extração é praticamente independente de manipulação.

Programa de Pós-Graduação em Química.
CNPq/Mapa; Capes; PIBIC-CNPq.

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Outeiro de São João Batista, s/nº, CEP 24020-141, Niterói, R.J, Brasil.
E-mail: annibal@vm.uff.br

Determinação espectrofotométrica de gossipol livre em fezes de ovinos utilizando-se espectros derivados em segunda ordem

Spectrophotometric determination of free gossypol in the feces of sheep using second-order derivative spectra

Cardoso, G. S.¹; Dantas, Â. M. M.¹; Pereira, E. F.¹; Amorim, F. S.¹; Silva, V. A. G. da¹; Souza, J. R. de¹; Viana, P. G.²; Louvandini, H.³

O gossipol é um pigmento polifenólico (C₃₀H₃₀O₈) encontrado naturalmente nas sementes de plantas da família Malvaceae, especialmente nas do gênero *Gossypium*. Atualmente, a semente do algodão vem sendo utilizada como complemento proteico em rações para gado, ovinos e outros animais. Contudo, estudos recentes demonstraram que a presença de gossipol em certos níveis apresenta alta toxicidade para os animais, com efeitos adversos, tais como perda de apetite, depressão da atividade respiratória, edemas pulmonares e problemas reprodutivos. Tendo em vista os efeitos tóxicos do gossipol, o objetivo do presente trabalho foi a identificação e quantificação de resíduos de gossipol em fezes de ovinos. No procedimento analítico adotado: 0,5 g de amostra foram extraídas com uma solução de acetona 70% e água 30% (v/v), por uma hora. O extrato resultante foi filtrado e acidificado com ácido clorídrico concentrado, levando-se para aquecimento a 65° C, por um período de uma hora. Em seguida, foi realizada uma extração com clorofórmio e a camada orgânica foi isolada e filtrada em funil de vidro contendo sulfato de sódio anidro. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até 1 mL e secos sob fluxo suave de nitrogênio até *secura*. O extrato seco foi redissolvido com uma mistura de solventes: etanol, água destilada, éter dietílico livre de peróxido e ácido acético glacial nas proporções 59,50:23,75:16,65:0,16; respectivamente. A leitura dos extratos foi realizada por UV-Vis e a sua quantificação foi obtida da média dos módulos das alturas D₁ 292,5 nm) e D₂ (299,0 nm) nos espectros derivados em segunda ordem. O método de segunda derivativa foi utilizado para reduzir os ruídos da curva e para eliminar as constantes que interferem na quantificação do gossipol. O método analítico utilizado mostrou-se linear (R₂ = 0,9995) nos testes realizados, tendo-se encontrado nas fezes um percentual médio de gossipol livre de 0,012 ± 1,66x 10⁻⁵%. O método utilizado mostrou-se eficiente para quantificar gossipol livre em fezes.

¹Universidade de Brasília, Instituto de Química, CP 04478, CEP 70904-970, Brasília, DF, Brasil.

E-mail: fabiullamorim@gmail.com

²Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, Brasil. ³Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, Brasil.

Prevalência das doenças neurológicas em bovinos no Estado do Paraná*

Prevalence of neurologic diseases in cattle of Paraná state, Brazil

Azambuja, R. O.; Queiroz, G. R.; Ribeiro, R. C. L.; Pereira, P. F. V.; Romão, F. T. N. M. A.; Flaiban, K. K. M. C.; Balarin, M. R. S.; Netto, D. P.; di Santis, G. W.; Reis, A. C. F.; Bracarense, A. P. F. R. L.; Alfieri, A. A.; Lisbôa, J. A. N.

Doenças do sistema nervoso central em bovinos englobam inúmeras enfermidades e são responsáveis por perdas econômicas expressivas em todo o mundo. Dentre elas, a raiva apresenta destaque, pois corresponde a perdas estimadas em 50 milhões de dólares por ano. Essas doenças assumiram grande importância após o aparecimento da encefalopatia espongiiforme bovina (EEB) em 1987 e da sua possível relação com a doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD)

em humanos. Os objetivos desta pesquisa foram investigar a ocorrência das doenças nervosas em bovinos no Estado do Paraná em parceria com o Serviço Oficial Estadual de Defesa Sanitária Animal (Seab-PR), estabelecendo o diagnóstico diferencial com a raiva, e gerando informações epidemiológicas para o estabelecimento de medidas adequadas de prevenção. O levantamento clínico e epidemiológico foi realizado nas propriedades onde ocorreram as enfermidades. Exames clínicos e neurológicos dos animais acometidos foram realizados, seguidos de colheita de amostras de sangue para realização de hemograma e bioquímica sérica, e de líquido para a análise. Nos casos mais graves, foi realizada a eutanásia seguida de necropsia com colheita de fragmentos de órgãos para exame histopatológico. Fragmentos do SNC foram encaminhados para exames de raiva, EEB e PCR para BoHV 1 e 5. Análises toxicológicas e bacteriológicas foram realizadas, quando pertinentes. De março de 2009 a agosto de 2011 foram acompanhados 96 casos classificados, segundo a etiologia em: causas tóxicas (50,0%); inflamatórias/infecciosas (31,2%); físicas (4,1%); neoplásicas (3,1%); metabólicas (2,1%); degenerativas (2,1%); e inconclusivas (7,3%). Dentre as intoxicações, 58,3% foram causadas por plantas, tais como *Senna occidentalis* e *S. obtusifolia* (15,58%), síndrome tremorgênica por *Cynodon dactylon* e *C. nlemfuensis* (12,5%), *Crotalaria* spp. (10,41%), *Acanthocladus brasiliensis* (6,25%), *Ateleia glazoviana* (6,25%), *Baccharis megapotamica* (4,16%) e *Tabernaemontana catharinensis* (4,16%). Botulismo e intoxicação por nitrito/nitrato foram responsáveis por 12,5% e 14,58% dos casos tóxicos, respectivamente. Tétano e enterotoxemia por *Clostridium perfringens* foram responsáveis, cada um, por 4,16% das causas tóxicas. Micotoxicose e intoxicação por carbamato foram responsáveis por 2,08% cada uma. Das doenças de origem inflamatória/infecciosa, a raiva (36,66%) e a encefalite por BoHV-5 (43,33%) foram as mais comumente encontradas. Os sete casos inconclusivos corresponderam à encefalopatia, tetraparesia flácida, convulsão e incoordenação leve. A baixa porcentagem de casos inconclusivos deve-se à abordagem mais completa da investigação compreendendo a identificação dos fatores de risco presentes nas propriedades, a interpretação das manifestações clínicas apresentadas, a integração racional entre as diferentes rotinas laboratoriais de diagnóstico e a interpretação final do conjunto dos resultados. Pode-se concluir que, além da raiva, outras enfermidades do sistema nervoso, como a encefalite por BoHV-5 e as intoxicações por plantas, ocorrem com frequência em bovinos no Estado do Paraná, representando 42,7% do total de casos investigados.

*Apoio financeiro Mapa/CNPq 578645/2008-4.

Universidade Estadual de Londrina, CP 3001, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brasil.

E-mail: janlisboa@uel.br

Eficiência das análises microbiológicas sobre as análises físico-químicas para o controle de qualidade do mel*

Efficiency of microbiological analysis on the physical and chemical analysis for quality control of honey

Lorenzon, M. C.^{1***}; Keller, K. M.^{1***}; Sant'ana, L. O.⁴; Devesa, M. V.⁴; Sousa, J. P. M.^{4*}; Rosa, C. A. R.³; Castro, R. N.⁴; Tassinari, W. S.⁵; Soares Neto, J.⁶

O incremento do agronegócio apícola torna premente o controle de qualidade de seus produtos, de modo a prevenir eventuais gargalos na sua comercialização e para resguardar os princípios de sanidade das abelhas. Para

prover subsídios aos serviços da Defesa e Inspeção Sanitárias e em trabalho conjunto com esses setores, foi desenvolvida pesquisa que avaliou a eficiência das análises físico-químicas de rotina (HMF, acidez e umidade) e das análises microbiológicas (atividade de água, enumeração bacteriológica e micotoxicológica), para atestar a qualidade do mel e pólen apícola e apresentar as principais causas de sua reprovação. As análises abrangeram 220 amostras de mel e 26 de pólen apícola, presentes no mercado do Estado do Rio de Janeiro. Também foram realizadas análises de substâncias antioxidantes do mel, para atestar o valor do produto como alimento funcional. A reprovação do mel pelas análises físico-químicas não se justapõe à contaminação microbiológica e, com base na portaria SVS/MS nº 451 de 19/09/1997, que foi revogada, as análises microbiológicas atestam que 57% das amostras de mel exibiram condições higiênico-sanitárias impróprias; houve reprovação de 92% das amostras de pólen apícola. A análise fúngica é a que destaca maior contaminação, quando comparada à bacteriológica. *Aspergillus* e *Penicillium* foram os fungos mais frequentes nos méis. Destaca-se que 30% das cepas de *Aspergillus flavus* foram capazes de produzir micotoxinas. A contaminação bacteriológica foi de 36%, com presença de *Bacillus* e *Enterobacter*, entre outras. O percentual de reprovação físico-química dessas amostras foi de 29%. As análises orgânicas mostraram que os méis fluminenses apresentam amostras com alta atividade antioxidante, por vezes maior do que a dos méis de origem europeia. A contaminação microbiológica é um fiel indicador da higiene durante todas as etapas da cadeia produtiva, sendo a mais recomendável para uma análise mais apurada das condições tecnológicas da criação. É possível que o domínio da infecção fúngica e de micotoxinas seja resultado da falta de prevenção de doenças em muitas regiões fluminenses, como a cria ensacada brasileira (CEB), cujas análises *in loco* ressaltaram alta atividade fúngica.

*CNPq/Mapa/SDA Nº 064/2008, processo 578134/2009-o.

**Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (DSc.).

***Bolsista CNPq.

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Produção Animal, Instituto de Zootecnia
Rod BR 465, km 7, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: lorenzon_ufrj@yahoo.com.br

²Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, Valença, RJ, Brasil.

³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Seropédica, RJ, Brasil.

⁴Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Seropédica, RJ, Brasil.

⁵Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Matemática, Instituto de Ciências Exatas, Seropédica, RJ, Brasil.

⁶Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Varição sazonal da composição química do leite cru inspecionado nas indústrias e laticínios da região nordeste do Brasil*

Seasonal variation of chemical composition of raw milk and dairy industries inspected in Northeast of Brazil

Barbosa, S. B. P.; Ribeiro Neto, A. C.; Jatobá, R. B.**; Silva, M. J. A.; Batista, A. M. V.; Silva, A. M.**; Freitas, S. F. A.**; Silva, M. J. F. B.**

A região Nordeste do Brasil produz cerca de 13% da produção nacional, estimada em 30 bilhões de litros no ano de 2010. Essa produção é oriunda, principalmente, de pequenos produtores rurais e/ou agricultores familiares, o que reflete uma situação social na região. O conhecimento da composição química do leite nessa região, que apresenta ao longo do ano temperaturas que variam entre 20 e 30° C, precipitação pluviométrica bastante irregular, gado cruzado zebu-holandês (girolando) e alimentação baseada em pastos, permitirá o estabelecimento de diretrizes que possam orientar os produtores no manejo dos seus rebanhos e na comercialização do leite. Foram utilizadas 116.989 amostras de leite cru inspecionado das indústrias nos nove Estados do Nordeste do Brasil, no período de julho/2007 a junho/2010, referentes aos teores de gordura (G), proteína (P), lactose (L), sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD). Os dados foram divididos em três períodos, de acordo com a Instrução Normativa 51, e analisados segundo o PROC GLM (SAS). Os valores médios de G, P, L, ST e ESD foram 3,66 ± 0,53; 3,16 ± 0,22; 4,41 ± 0,18; 12,10 ± 0,66 e 8,44 ± 0,33, respectivamente. Maiores valores de G, P e ESD foram observados nos meses de abril e maio, correspondendo ao período de maior precipitação na região. Já valores mais baixos de G e P foram observados nos meses de outubro e novembro, correspondentes aos meses mais secos, enquanto ESD apresentou seu valor mais baixo no mês de março, quando ocorre a maior média de precipitação. Nos três períodos analisados houve diferenças significativas entre os constituintes avaliados, entretanto não se observou nenhuma tendência definida. Há diferenças importantes entre os Estados da região e isso reflete, provavelmente, condições peculiares de manejo e alimentação. Os resultados obtidos ressaltaram a importância da consideração das variáveis causais na composição do leite e a necessidade de se investir em programas de alimentação e melhoramento genético, que contribuam para o melhor desempenho da atividade leiteira na região.

*CNPq/Mapa/SDA nº 064/2008.

**Bolsistas CNPq, Capes, Facepe.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia
R. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.
E-mail: sbarbosa@dz.ufrpe.br

Pesquisa etiológica da miopatia dorsal cranial em frangos de corte

Etiologic investigation of dorsal cranial myopathy in broilers

Zimmermann, F.³; Fallavena, L. C. B.²; Salle, F. O.^{1*}; Moraes, L. B.^{1**}; Moraes, H. L. S.¹; Salle, C. T. P.¹; Nascimento, V. P.¹

A indústria avícola brasileira é uma atividade econômica muito importante para o País. Recentemente, uma lesão muscular, localizada cranialmente no dorso de frangos de corte, vem causando grandes perdas econômicas devido à condenação de carcaças. Machos de linhagens pesadas, com as maiores médias de peso e idade de abate apresentam as maiores frequências de condenação devido à referida lesão. As lesões são caracterizadas por amarelamento e inchaço da pele que recobre o músculo lesado. Após abertura da pele, pode-se notar edema subcutâneo, hemorragia muscular superficial, palidez, aderência, aumento da espessura e consistência envolvendo sempre o músculo anterior *latissimus dorsi*. Histologicamente, a lesão é polifásica e inclui variação no tamanho e partição das fibras (*splitting*), degeneração hialina, necrose, regeneração e intensa fibrose com presença de adipócitos e infiltrado linfo-histiocitário. A etiologia dessa miopatia é desconhecida e não foram encontradas

publicações detalhadas a respeito desse assunto. Os objetivos do presente trabalho foram detectar a etiologia da miopatia dorsal cranial, bem como de verificar se a lesão apresenta um potencial risco à saúde pública. Para atender a esses objetivos, foram conduzidos experimentos de avaliação da associação entre a miopatia dorsal cranial e a síndrome ascítica; de ausência de inclusão de vitamina E e selênio na dieta de frangos de corte, na tentativa de reproduzir a lesão; quantificação de vitamina E (alfa tocoferol) e selênio em músculos lesados e músculos normais; avaliação do papel do exercício na indução da miopatia dorsal cranial, bem como sua associação com a miopatia peitoral profunda. Também foram realizadas pesquisas de bactérias de interesse em saúde pública em músculos com lesão. Não há risco de intoxicação através do consumo do músculo anterior *latissimus dorsi* lesado ou normal em relação às bactérias pesquisadas. Os níveis médios de alfa tocoferol e selênio nos músculos anterior *latissimus dorsi* lesados ou normais são compatíveis com os níveis de carcaças usualmente suplementadas. Músculos com lesão apresentaram níveis mais elevados de selênio do que músculos sem lesão. Pode-se constatar, também, a ausência de associações entre a miopatia dorsal cranial e a síndrome ascítica, bem como à miopatia peitoral profunda. A causa, ou as causas, da miopatia dorsal cranial não foi(foram) identificada(s). Contudo foi possível a conclusão de que o exercício e a ingestão de baixos níveis de vitamina E não estão envolvidos no processo.

*Bolsista de Pós-Doutorado, PPG-Cirurgia.

**Bolsista CNPq DTI-1.

Apoio Financeiro: Mapa/CNPq.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia

Av. Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: ctps@ufrgs.br

²Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil.

³Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.

Avaliação da depleção linfóide folicular da bursa de Fabricius: uma metodologia alternativa que emprega análise digital de imagem e redes neurais artificiais

Evaluation of follicular lymphoid depletion in the Bursa of Fabricius: an alternative methodology using digital image analysis and artificial neural networks

Moraes, L. B.^{1*}; Osório, F. S.²; Salle, F. O.^{1**}; Souza, G. F.³; Fallavena, L. C. B.⁴; Nascimento, V. P.¹; Santos, L. R.⁵; Moraes, H. L. S.¹; Salle, C. T. P.¹

A avicultura industrial apresenta altos índices produtivos e caracteriza-se pela alta tecnificação e eficiência. Contudo, inúmeros fatores podem prejudicar esses resultados. Dentre os mais importantes citam-se as doenças imunodepressoras, consideradas causas primárias responsáveis pelo estabelecimento de inúmeros patógenos capazes de agravar o quadro clínico das aves, elevando ainda mais as perdas. Em vista disso, foi pesquisado um método mais eficaz para a determinação da depleção linfocitária da bolsa de Fabricius, órgão fundamental para a proliferação e maturação de linfócitos B. Dentre as doenças que mais acometem a bolsa de Fabricius encontram-se a doença infecciosa da bolsa de Fabricius, as micotoxicoses e a anemia infecciosa. Foram utilizadas 50 amostras de bolsa de Fabricius coletadas intactas, processadas e o escore óptico de depleção foi estabelecido (de 1 a 5). As bolsas foram divididas em

quadrantes e 12 foliculos selecionados por amostra. As imagens foram adquiridas, analisadas com o software MatLab® 6.5 e suas características extraídas. Com os dados foram geradas redes neurais (Neuroshell®), comparando-se os escores óticos e a classificação realizada pela rede. A rede foi capaz de classificar corretamente, com alta sensibilidade (até 89,81%) e especificidade (até 96,17%) a maioria dos foliculos, tendo um melhor desempenho utilizando-se três categorias (sensibilidade de até 79,39% e especificidade de até 91,94%) e duas categorias (sensibilidade e especificidade chegando a 92,54%). Os resultados mostraram que é possível a utilização de análise de imagem e redes neurais para a classificação histopatológica de depleção linfocitária da bolsa de Fabricius. A análise de imagem é uma ferramenta prática, com resultados objetivos, dimensiona o erro classificatório e padroniza a avaliação da depleção linfocitária da bolsa.

*Bolsista CNPq DTI-1, CDPA-UFRGS.

**Bolsista de Pós-Doutorado, PPG-Cirurgia, Fac. Medicina – UFRGS.

Auxílio Financeiro: Mapa/CNPq.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia

Av. Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: ctps@ufrgs.br

²Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

³Diplomata Alimentos, Concórdia, SC, Brasil.

⁴Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil.

⁵Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Implicações para exatidão na quantificação do gossipol livre: I. Análise da variabilidade intrínseca à matriz

Implications for accuracy in quantifying free gossypol: I. Analysis of intrinsic matrix variability

Romero, A. C.; Uliana, R.; Mariano, I. C.; Louvandini, H.; Abdalla, A. L.

O gossipol é um alcalóide polifenólico tóxico presente em plantas do gênero *Gossypium*, como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) e apresenta toxicidade na forma livre. Após a prensagem do caroço, o gossipol complexa-se com proteínas, convertendo-se à forma ligada, menos tóxica. Para a análise da toxicidade, o gossipol livre deve ser mensurado considerando-se também fatores como variabilidade intrínseca à matriz e à metodologia analítica. A cromatografia líquida de alta eficiência tem se mostrado eficiente, considerando sua exatidão e sensibilidade. Entretanto, é imprescindível que a amostra analítica seja capaz de representar adequadamente a amostra total. Neste estudo, foi avaliada a variação do teor de gossipol individual entre 75 caroços de algodão de uma mesma variedade (IAC 25-RMD), colhidos num mesmo período, a fim de verificar a variabilidade presente em 5g de amostra, como proposto para amostra analítica pela AOCS. A metodologia para extração do gossipol livre proposta por Wang foi utilizada, com algumas modificações. Os caroços descascados foram pesados, triturados, macerados em acetona (10 mL) por 16h, filtrados em papel de filtro sob vácuo, com três lavagens do resíduo com 2 mL de acetona. O filtrado foi seco e redissolvido em 10 mL de clorofórmio:ácido acético (99:1, v/v). Na cromatografia foi utilizada coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm, i.d. 5 µm), eluição gradiente (80:20; metanol-0,1% ácido ortofosfórico:água, 70:30 v/v, e clorofórmio), com fluxo de 1,1 mL minuto-1 e detecção a 254 nm (detector de arranjo de fotodiodos). O peso médio

dos caroços sem casca foi de $0,06 \pm 0,01g$ e o teor de gossipol apresentou uma ampla faixa, de 298 a $9.644 \mu g g^{-1}$ (média = $1.028,6 \mu g g^{-1} \pm 1.058,3$). Não houve correlação entre o peso do grão e o teor de gossipol. O alto coeficiente de variabilidade observado (102%), dos quais apenas 10% podem ser provenientes da metodologia, sugere a possibilidade de sub ou superestimativa do gossipol a ser administrado na alimentação animal e pode dificultar a realização de estudos para comparação de metodologias analíticas. Observou-se que vários estudos utilizam quantidades de caroço de algodão menores que 1g, com base no teor esperado de gossipol presente, como proposto pela AOCS. Por outro lado, a realização de moagem de uma quantidade maior de caroço de algodão, a fim de oferecer maior representatividade da amostra e diminuir a variabilidade, favorece a conversão do gossipol livre à forma ligada, menos tóxica e não extraída em acetona. Uma possibilidade para contornar esse problema é a realização da moagem do caroço de algodão em acetona, formando uma pasta a partir da qual a amostra analítica pode ser obtida.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, concessão de bolsa de estudos (2009/51265-9) e a Mapa/CNPq 578541/2008-4.

Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Av. Centenário, 303, CEP 13416-000, Piracicaba, SP, Brasil.

E-mail: acromero@cena.usp.br

Implicações para exatidão na quantificação do gossipol livre: II. Variabilidade associada à extração e efeito do tempo de maceração

Implications for accuracy in quantifying free gossypol: II. Variability associated to extraction and time for maceration

Romero, A. C.; Mariano, I. C.; Uliana, R.; Louvandini, H.; Abdalla, A. L.

O gossipol é um alcalóide polifenólico tóxico presente em plantas do gênero *Gossypium*, como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) e apresenta toxicidade na forma livre. Neste estudo, foi mensurada a contribuição da metodologia analítica para a variabilidade dos resultados, bem como o efeito do tempo de maceração em relação ao teor extraído. A metodologia proposta por Wang foi utilizada, com algumas modificações. Para a obtenção uma amostra com teor de gossipol homogêneo para as replicatas, 2,04 g de caroços descascados foram triturados em acetona (10 mL). A pasta obtida foi filtrada e as partículas foram passadas por peneiras de 1 mm e 0,25 mm. Foram realizadas seis replicatas com 1 e 0,25 mm de granulometria, às quais foram adicionados 10 mL de acetona e macerados por 16h, para obter a variabilidade analítica. O extrato foi filtrado em papel de filtro sob vácuo, seco e redissolvido em 10 mL de clorofórmio:ácido acético (99:1, v/v). A cromatografia foi realizada em coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm, i.d. 5 μm), eluição gradiente (80:20; metanol-0,1% ácido ortofosfórico:água, 70:30 v/v, e clorofórmio), com fluxo de 1,1 mL .minuto⁻¹ e detecção a 254 nm (DAD). Para a avaliação da influência do tempo de maceração no teor de gossipol extraído, foi realizado o mesmo preparo destinado a obtenção de partículas de 0,25 mm. Foram analisados os tempos 1, 2, 4, 8 e 16h de maceração. A análise das replicatas não apresentou diferença no coeficiente de variabilidade entre as granulometrias (11,5 e 10,3%, 1 e 0,25 mm, respectivamente). Observou-se que as replicatas de menor tamanho apresentaram menor teor de gossipol extraído ($650 \mu g g^{-1} \pm 68$ e $1.691,45 \mu g g^{-1} \pm 159$), provavelmente devido à extração por prensagem manual para o preparo da amostra em acetona, a exemplo do que ocorre durante a moagem convencional, na qual o gossipol liberado entra em contato com outras

proteínas e pode se complexar e originar o gossipol ligado. Com relação ao efeito do tempo de maceração, considerando 16h de maceração como 100% de extração ($3.896,05 \mu g g^{-1}$), observou-se que os tempos inferiores (1, 2, 4 e 8h) apresentaram 70 ($2.715,7 \mu g g^{-1}$), 74 ($2.887,7 \mu g g^{-1}$), 73 ($2.864,8 \mu g g^{-1}$) e 72% ($2.792,6 \mu g g^{-1}$) do teor de gossipol. Embora sejam inferiores ao tempo referência, os valores não diferem entre si num período de 1 a 8h. É possível que tempos a partir de uma hora sejam suficientes para a extração de uma quantidade de gossipol, provavelmente ligada à matriz mais superficialmente. Entretanto, ao longo de 16h, o teor restante, aderido fortemente a matriz, é extraído pelo maior tempo de contato com a acetona.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, concessão de bolsa de estudos (2009/51265-9) e a Mapa/CNPq 578541/2008-4.

Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Av. Centenário, 303, CEP 13416-000, Piracicaba, SP, Brasil.

E-mail: acromero@cena.usp.br

Desenvolvimento de novos métodos analíticos para verificação da qualidade do leite de vaca

Development of new analytical methods for cow milk quality evaluation

Santos, P.M.¹; Colnago, L.A.²; Pereira-Filho, E.R.¹

O leite de vaca tem sido frequentemente alvo de processo de adulteração não só no Brasil, mas também em outros países. Como resultado dessa prática, é necessário o desenvolvimento de novos métodos destinados à avaliação da autenticidade desse alimento. Nesse contexto, o presente trabalho investigou comparativamente a potencialidade de quatro diferentes métodos analíticos adotados para verificar a qualidade do leite bovino: análise multivariada de imagens digitais, ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN-LR), espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Para isso, amostras de leite bovino cru de boa qualidade foram adulteradas com a adição de água, peróxido de hidrogênio, soro de leite, leite sintético e urina, em diferentes proporções, de modo a fornecerem amostras com 5, 15, 25, 35 e 50% (v/v) de adulteração. No caso da soda cáustica, amostras de leite de boa qualidade foram submetidas a um processo natural de degradação (com diminuição do pH) e, em seguida, foi adicionada soda cáustica para reestabelecer o pH original. Para obtenção das imagens digitais, 5 mL da amostra de leite foram misturados com 100 mL de um indicador ácido-base e, em seguida, digitalizados em um scanner HP, modelo color laserjet CM1312 MFP. Essas imagens foram analisadas com a média de dez parâmetros de cor: R, G, B, H, S, V, L (luminosidade), e dos coeficientes tricromáticos (r , g e b). As mensurações de RMN foram efetuadas no espectrômetro SLK-SG-100 com aplicação da sequência de pulso CPMG. Os espectros de NIR foram adquiridos no modo absorvância de um espectrômetro. Já o monitoramento das concentrações de Na e Ca foi efetuado em um espectrômetro. Todos os dados obtidos foram analisados com auxílio de ferramentas estatísticas e os resultados indicaram que esses métodos apresentam um elevado potencial para verificação da qualidade do leite bovino. Os modelos de classificação construídos com os resultados obtidos via análise multivariada de imagens digitais, RMN e NIR demonstraram que essas propostas são capazes de identificar, com alta eficiência, uma amostra de leite adulterado quando a concentração do adulterante presente é superior a 25%. Resultados obtidos

a partir de modelos de regressão demonstraram que esses métodos podem quantificar concentrações de adulterantes superiores a 6,40%. O monitoramento das concentrações de Ca e Na, revelou que o aumento da concentração dos adulterantes na amostra resulta em um decréscimo nas concentrações desses metais da ordem de 70%, exceto para a adulteração com NaOH, que resulta em um aumento significativo (de 150%) na concentração de Na.

Fapesp, CNPq e Capes.

¹Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, Grupo de Análise Instrumental Aplicada, Rod. Washington Luís, km 235, SP-310, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: erpf@uol.com.br

²Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brasil.

Peso e distribuição do tecido adiposo em ovelhas alimentadas durante períodos prolongados com farelo de mamona detoxificado*

Weight and distribution of adipose tissue in sheep feeding whit detoxified castor bean meal

Silva, L. M.; Duarte, S. S.; Oliveira, C. H. A.; Goes, K. L. S.; Rodrigues, F. V.; Fernandes, C. C. L.; Silva, A. M.; Rondina, D.

Com a crescente utilização do biodiesel como fonte alternativa de combustível, tem sido gerada uma grande quantidade de diversos subprodutos, dentre eles encontra-se o farelo de mamona. O uso do mesmo constitui uma importante alternativa para a alimentação de ovinos, pois possui elevado valor nutritivo e baixo custo de produção. Porém, sua utilização para essa finalidade é limitada, pois contém uma potente toxina, a ricina, que limita o seu uso, fazendo-se necessária uma prévia detoxificação para sua utilização. Por estar diretamente ligado ao manejo nutricional, o tecido adiposo é um fator importante para avaliação do estado nutricional do animal e qualidade de carcaça na ovinocultura. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a distribuição anatômica do tecido adiposo de ovelhas alimentadas com farelo de mamona detoxificado por períodos prolongados. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (Ceua-Uece), com o número de protocolo: 09503497-8/82. Para realização do tratamento de detoxificação, foi escolhido o processo de adição de óxido de cálcio (CaO) ao subproduto. Foram utilizadas 24 ovelhas, pluríparas, com pesos homogêneos, divididas em dois grupos: grupo controle (n = 12), recebendo feno de tifton e concentrado (80% milho, 15% farelo de soja, 5% minerais); e grupo mamona detoxificada (n = 12), alimentadas com feno de tifton e concentrado com farelo de mamona detoxificada, substituindo o farelo de soja. Após 18 meses de alimentação, os animais foram pesados e abatidos. Foram verificados o peso da carcaça, dos tecidos adiposo omental e perirrenal, e do coração. Os valores obtidos foram avaliados e comparados pelo programa de estatística. O peso vivo ao abate e o peso da carcaça foram similares (p > 0,05) entre os tratamentos, com média ± erro-padrão respectivamente de 32,21 ± 0,95 kg e 14,69 ± 0,46 kg, no grupo-controle e farelo de mamona. Além disso, não foi verificado efeito do tipo de dieta (p > 0,05) sobre o peso e a distribuição do tecido adiposo nos diferentes sítios anatômicos, sendo observado o peso do tecido adiposo omental de 753,33 ± 94,95g, do rim direito 149,95 ± 26,32g, do rim esquerdo 200,71 ± 27,17g e do tecido adiposo do coração de 76,88 ± 20,89g. Diante disso, a conclusão foi que a administração de farelo de mamona detoxificado não afetou a distribuição do tecido adiposo.

*CNPq/Mapa/SDA n° 064/2008 – ref. n° 578189/2008-9 e Edital MCT/CNPq N° 70/2009 ref. n° 551634/2010-3.

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes

Av. Paranajana, 1700, CEP 60714-903, Fortaleza, CE, Brasil.

E-mail: liligomesvet@hotmail.com

Utilização de mamona detoxificada na alimentação de ovelhas durante períodos prolongados: aspectos macroscópicos e pesagem de diferentes órgãos*

Usage of detoxified castor bean meal for feeding sheep during prolonged periods: macroscopic aspect and weight of different organs

Silva, L. M.; Duarte, S. S.; Oliveira, C. H. A.; Goes, K. L. S.; Rodrigues, F. V.; Fernandes, C. C. L.; Rondina, D.

Atualmente, o farelo de mamona é um dos principais resíduos da cadeia do biodiesel, no nordeste do Brasil. No entanto, sua utilização como fonte alimentar tem sido limitada, devido principalmente à presença de substâncias tóxicas, tais como a ricina. Todavia, diversos pesquisadores tem desenvolvido técnicas para desnaturar essa proteína tóxica, tornando esse resíduo viável para ser utilizado na alimentação animal. Diante disso, é necessário que se avalie se a utilização desse resíduo altera o metabolismo e excreção animal, principalmente causando alterações hepáticas, pois o fígado é o principal órgão ligado ao metabolismo. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi verificar o peso e os aspectos macroscópicos de diferentes órgãos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (Ceua-Uece), com o número de protocolo 09503497-8/82. O tratamento de detoxificação foi realizado mediante a adição de óxido de cálcio (CaO) ao subproduto, por ser uma técnica simples e comprovadamente eficaz. Vinte e quatro ovelhas pluríparas, com pesos homogêneos, foram divididas em dois grupos: o grupo-controle (n = 12), recebendo feno de tifton e concentrado (80% milho, 15% farelo de soja, 5% minerais); e grupo mamona detoxificada (n = 12), alimentadas com feno de tifton e concentrado com farelo de mamona detoxificada substituindo o farelo de soja. A dieta foi fornecida durante 18 meses. Ao final desse período, os animais foram abatidos e foi verificada a presença de alterações macroscópicas do coração, fígado, baço e rins, bem como tomado o peso desses órgãos. Os valores obtidos foram avaliados e comparados pelo programa Estatística, utilizando o peso individual do órgão, porém, no caso dos rins, foi utilizada a somatória do peso do par de órgãos. Todos os órgãos apresentavam aspectos macroscópicos normais. No entanto, houve diferenças significativas no peso do fígado (grupo controle: 440,83 ± 81,74 g; grupo mamona 511,67 ± 150,84 g; p < 0,05). Já com relação aos demais órgãos, não foi verificada diferença significativa (coração, grupo controle: 149,58 ± 23,50 g, grupo mamona: 158,75 ± 34,58 g; baço, grupo controle: 76,25 ± 19,08 g, grupo mamona: 70,45 ± 18,10 g; rins, grupo controle: 76,17 ± 12,10 g, grupo mamona: 82,50 ± 10,77 g, dados em média). Diante disso, foi possível a verificação de que a utilização do farelo de mamona na alimentação de ovinos, por longos períodos, pode induzir a distúrbios hepáticos.

*CNPq/Mapa/SDA n° 064/2008 – ref. n° 578189/2008-9 e Edital MCT/CNPq N° 70/2009 ref. n° 551634/2010-3.

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes
Av. Paranjana, 1700, CEP 60714-903, Fortaleza, CE, Brasil.
E-mail: liligomesvet@hotmail.com

Caracterização dos sistemas de criação de bovinos com atividade reprodutiva na região centro-sul do Brasil

Characterization of livestock production systems with reproductive activity at central-southern region of Brazil

Braga, G. B. *, Ferreira Neto, J. S.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Dias, R. A.

A atuação dos serviços de fomento e defesa sanitária animal é imprescindível para a proteção e manutenção do sucesso da cadeia produtiva de bovinos. Sendo assim, a compreensão do cenário espacial e das formas como as criações se inserem no contexto produtivo pode tornar mais efetivas as estratégias de atuação frente aos problemas do setor, ao auxiliar na tomada de decisões, elaboração de estratégias, direcionamento de recursos humanos e financeiros. Entre outubro de 2001 e dezembro de 2004, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realizou um inquérito soropidemiológico visando avaliar a situação da brucelose bovina em 14 Unidades Federativas do Centro-Sul, assim como encontrar possíveis fatores de risco associados à doença nos rebanhos. Isso possibilitou o recolhimento de diversas informações relacionadas às tipologias de rebanho, variáveis ligadas às características sanitárias, assim como àquelas ligadas à saúde pública. Os resultados obtidos demonstraram a alta heterogeneidade das criações no País, revelando diferenças significativas, mesmo dentro dos Estados. Em relação às tipologias de rebanho, a proporção de propriedades especializadas em carne ou leite concentrou-se em regiões específicas (Centro-Oeste e sul do Rio Grande do Sul e sul de Minas Gerais e região Sul, respectivamente). O sistema extensivo de criação foi o predominante em praticamente todas as regiões avaliadas, enquanto que os sistemas semi-intensivos demonstraram uma associação com áreas de produção leiteira e a proporção de confinamentos não chegou a 1% das propriedades. O gado mestiço ainda é o predominante nas criações (cerca de 56%), os zebuínos relacionam-se mais aos estabelecimentos de corte e o gado europeu, apesar das baixas frequências, concentra-se nas regiões Sul e Sudeste. O investimento em tecnologias de ordenha, resfriamento do leite e intensificação dos manejos ainda é baixo, sendo mais relacionado às propriedades especializadas de leite e crescente à medida que se avança em direção às Unidades Federativas da região Sul. Em relação às características sanitárias, a movimentação de reprodutores foi intensa e geralmente efetuada diretamente entre as propriedades e a frequência de propriedades com assistência veterinária limitou-se a 35%. Em relação às características de importância à saúde pública, em cerca de 21% das propriedades a prática de consumo de leite cru ainda é realizada e o abate sem inspeção oficial foi relatado por 49% dos estabelecimentos. Considerando a complexidade e as características da região produtiva, os órgãos de defesa sanitária animal e de inspeção seriam fortemente auxiliados por um sistema dinâmico de obtenção de informações a respeito das características das criações.

*Bolsista Capes: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270
São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: guibraga@vps.fmvz.usp.br

Estudo comparativo de métodos de avaliação da morfologia, integridade de membrana plasmática e acrossoma visando à melhor forma de fiscalização do sêmen criopreservado bovino importado

Comparative study of methods for evaluating the morphology, plasma membrane integrity and acrosome seeking the best way of monitoring imported bovine cryopreserved semen

Cunha, E. R. *; Silva, C. G. *; Cunha, A. T. M. **; Bessler, H. C.; Martins, C. F.

A avaliação de somente um parâmetro para fiscalização do sêmen criopreservado não garante sua condição de viabilidade, portanto uma análise multifatorial é mais apropriada para o diagnóstico da funcionalidade e integridade dos espermatozoides. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar diferentes metodologias de avaliação de morfologia, integridade de membrana plasmática e acrossoma com a finalidade de encontrar a melhor estratégia de análise do sêmen criopreservado bovino importado visando à fiscalização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Foram utilizadas amostras de sêmen de 24 touros das raças Aberdeen Angus e Holandês, que foram descongeladas a 36° C/30s e, em seguida, realizadas as avaliações de: a-Morfologia: microscopia de campo claro com rosa bengala (RB) versus dupla coloração Trypan Blue-Giemsa (TBG) versus microscopia direta de Contraste de Fase (CF); b-Integridade de membrana plasmática (IMP): coloração com eosina nigrosina (EN) versus sonda fluorescente iodeto de propídeo (IP) - acetato de carboxifluoresceína (FDA); c-Integridade de acrossoma: microscopia de campo claro com TBG versus sonda fluorescente PNA-FITC-IP. Na avaliação de morfologia espermática não houve diferença entre os métodos de CF e RB, respectivamente, identificando-se 20,31 ± 8,58% e 21,27 ± 10,13% de anormalidades. Porém, o uso do CF tornou a avaliação mais precisa, porque identificou facilmente patologias como *diadema defect* e *knobbed sperm*. O método com TBG identificou mais anormalidades (36,81 ± 10,41%) que os outros métodos, possivelmente devido a sua forma de preparo. A sonda fluorescente FDA-IP identificou significativamente menos espermatozoides com membrana plasmática íntegra que o método com EN (49,58 ± 12,39% e 63,58 ± 13,35%, respectivamente). Na avaliação de integridade do acrossoma, os testes com TBG e PNA-FITC-IP identificaram, respectivamente, que 44,47 ± 14% e 39,79 ± 11,39% dos espermatozoides apresentaram o acrossoma íntegro, não havendo diferenças significativas entre os testes. Os resultados obtidos demonstraram que para a fiscalização do sêmen bovino criopreservado é mais indicado o uso dos métodos de CF para morfologia, FDA-IP para integridade de membrana plasmática e TBG ou PNA-FITC-IP para integridade de acrossoma. No entanto, as sondas fluorescentes parecem ter sido mais sensíveis que as outras técnicas, pois não apresentam interferência com o meio extracelular, permitindo uma análise mais criteriosa do sêmen. Os corantes Rosa Bengala, Eosina-Nigrosina e Trypan Blue-Giemsa devem ser considerados como segunda opção para análise do sêmen criopreservado, sendo o seu uso mais indicado no campo, para uma avaliação inicial das amostras.

CNPq\Mapa, Embrapa Cerrados.

*UnB-Capes.

** CNPq.

Embrapa Cerrados

Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira
BR 020, km 18, CEP 73310-970, Planaltina, DF, Brasil.

E-mail: carlosfrederico@cpac.embrapa.br

Vigilância da sanidade de animais de interesse econômico do Estado do Rio de Janeiro pelo Laboratório de Biologia Animal da Pesagro-Rio

Monitoring of the health state of animals of economical interest in the state of Rio de Janeiro by the Laboratório de Biologia Animal of Pesagro-Rio

Romijn, P. C.; Kimura, L. M. S.; Pinheiro, J. G.; Magalhães, H.; Santos, M. W. dos; Liberal, M. H.; Moura, R.; Costa, C. H. C.; Lopes, A. S.; Carvalho, L. S.; Bittencourt, N. R. A.; Rouge, L. M. S.; Vidal, N. M.

O Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal – CEPGM (antigo Laboratório de Biologia Animal) da Pesagro-Rio realiza pesquisa diagnóstica de doenças dos animais e a vigilância de enfermidades que comprometem a Saúde Pública e a sanidade de animais de interesse econômico do Estado do Rio de Janeiro, desde 1978. Visando à ampliação e consolidação da competência nacional em sanidade animal, fortalecendo os mecanismos de integração, e colaborando com as atividades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o CEPGM realiza atividades diagnósticas relevantes bem como a retroalimentação constante das informações e conhecimentos gerados. Para ampliar a competência científica, tecnológica e de gestão, e melhorar a qualidade e inocuidade de produtos de origem animal e de insumos agropecuários, medidas foram tomadas para adequar cada área do CEPGM às normas de qualidade e biossegurança, manter/obter o credenciamento para o diagnóstico de anemia infecciosa equina, brucelose, raiva; enterobactérias, realizar a colimetria e exames histopatológicos dentro das normas atuais. Até o presente, foram atendidas três exigências de credenciamento para diagnóstico, foi montado um ambiente de biossegurança 3 e instalado um programa-piloto de processamento informatizado de dados em análise epizootológica, que permitiram a prevenção, vigilância e intervenções rápidas de doenças infectocontagiosas de notificação obrigatória e/ou de importância para a saúde pública e sanidade animal. Também será possível a elaboração de mapas epizooticos das enfermidades sob estudo (raiva, AIE e brucelose) e outras detectadas por exames bacteriológicos, virológicos e histopatológicos. A estrutura montada vem permitindo o desenvolvimento de diagnósticos e pesquisa em sanidade animal, além da formação de recursos humanos, e está portanto contribuindo diretamente para a melhoria da Defesa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro e do País.

Auxílio financeiro CNPq/Mapa Edital 64/2008.

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – Pesagro-Rio, Al. São Boaventura, 770, CEP 24120-191, Niterói, RJ, Brasil.

E-mail: phyllis@pesagro.rj.gov.br

Determinação do teor de hidroxiprolina em diversas classes de embutidos e em carnes industriais

Determination of hydroxyproline content of different kinds of meat and meat products

Oliveira, A. L.; Oliveira, R. B. P.²

De modo geral, as carnes utilizadas para elaboração de embutidos emulsionados são as carnes industriais da linha de abate, retalhos e aparas provenientes da desossa. Apresentam elevado teor de proteínas não miofibrilares, como as do tecido conjuntivo colagênico, de baixo valor biológico por serem pobres

em lisina, triptofano e aminoácidos sulfurados. As indústrias processadoras tendem a incorporar quantidades variáveis desses ingredientes em suas formulações durante o processamento, procurando reduzir custos de produção, para se tornarem mais competitivas. O tecido conjuntivo colagênico possui como aminoácido exclusivo e característico a hidroxiprolina. No Brasil, o Ministério da Agricultura permite a adição de até 10% de pele, tendões e vísceras, segundo o tipo de embutido e suas peculiaridades, porém não estabelece limites para teor de colágeno nesses produtos. A determinação da quantidade de colágeno visa não apenas caracterizar o valor comercial das matérias-primas que lhe deram origem, como também os aspectos nutricionais e comerciais. O seu teor é utilizado como indicador da qualidade dos embutidos na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos (EUA). O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de hidroxiprolina em carnes industriais: pele suína (n = 10), retalhos/aparas de bovinos (n = 10) e carne mecanicamente separada (CMS) de aves (n = 10), e emulsionados salsichas (n = 10) e mortadelas (n = 10) comercializados no País. As amostras de carnes industriais e CMS foram obtidas em duas diferentes indústrias e as de salsicha e mortadela, no comércio varejista. O método é baseado em hidrólise com ácido sulfúrico, seguida de oxidação pela cloramina T, formando um composto vermelho-púrpura, medido por espectrofotometria a 560 nm. Os teores médios obtidos de hidroxiprolina e colágeno nas matérias-primas foram significativamente mais elevados (p < 0,05) que nas amostras de produtos emulsionados. Os valores médios de hidroxiprolina nas carnes industriais variaram de 1,5% (pele de suíno) a 0,43% (em CMS de frango). As amostras de emulsionados analisados apresentaram baixos teores de hidroxiprolina, com médias de 0,13% (para salsichas) e 0,23% (para mortadelas). Os resultados obtidos indicaram que os produtos emulsionados pesquisados apresentaram adequada qualidade, considerando-se os percentuais de hidroxiprolina conforme estabelecido pela UE e EUA.

Projeto financiado pelo CNPq / Processo: 578633/2008-6.

¹Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção de POA, Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: afonso.de.liguori@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Projeto de treinamento em validação intra e interlaboratorial de métodos analíticos e seu alcance

Training in single laboratory and interlaboratory validation of analytical methods and its achievements

Gonçalves, E.B.; Alves, A.P.G.*; Martins, P.A.*

Um projeto do Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), liderado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos, visa oferecer treinamentos em validação de métodos analíticos, abordando desde uma panorâmica em estatística até validação intralaboratorial e validação por ensaios interlaboratoriais, para instituições públicas e outras. O projeto visa alcançar os Laboratórios da Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, mas vem atingindo também instituições como a Embrapa, as Redes de Metrologia do Rio de Janeiro e de São Paulo, e outras, além de estatísticos para atuarem no

suporte a essas atividades, em especial, para a Defesa Animal. Os cursos usaram como material básico a ISO 17025, IN 24, RE 899, e principais guias de validação, nacionais e internacionais. Foram preparados por uma equipe de estatísticos experientes nesse tema e geraram apresentações com fundamentos de validação, seus princípios estocásticos e exercícios para estatísticos, bem como uma versão simplificada para demais profissionais. A equipe do projeto fez análise de normas e textos técnicos nacionais e internacionais, segundo a qual elaborou publicações assentadas em matéria probabilística e teórica envolvendo, principalmente, propriedade de cálculos de incerteza, regras de verificação de conformidade, delineamentos fracionados, a equivocada incerteza de amostragem, limite de decisão e capacidade de detecção (CC α e CC β), propriedade de métodos estatísticos propagados pelos textos existentes e validade da validação. Foram realizados treinamentos em validação intralaboratorial de métodos analíticos e em validação por interlaboratoriais e a chamada incerteza de amostragem, para estatísticos na Embrapa Solos. Os mesmos dois treinamentos, em versões simplificadas, e mais uma visão de estatística em forma de panorâmica foram ministrados cinco vezes em quatro Laboratórios do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, uma vez a um Laboratório do Ministério da Saúde, uma vez à Rede Rio de Metrologia, e parte deles ao Comitê Técnico de Química Analítica da Rede Metrológica de São Paulo. Vem sendo notado no público, durante os treinamentos, grande interesse e bom grau de assimilação do conteúdo, além de um princípio de massa crítica nessa matéria, o que era desejado. Adicionalmente, o projeto tem buscado repassar suas críticas técnicas a diversas instâncias, desde à ISO, ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento, até a missões técnicas envolvendo diversas instâncias normativas, visando reduzir riscos desnecessários aos nossos laboratórios e comércio internacional.

*DTI-CNPq

EMBRAPA Agroindústria de Alimentos,
Av. Américas, 29501, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: goncaleb@ctaa.embrapa.br

Concepção de mapa mental para sistematização da legislação nacional em sanidade animal

Mind map conception to systematization of the national animal health legislation

Strehl, A. M.; Zuge, R. M.; Malinowski, A.

Sabe-se que ainda hoje muitas enfermidades que afetam os produtos do setor agropecuário são oriundas da falta de conhecimento dos padrões estabelecidos para esse campo e que muitas barreiras sanitárias são levantadas quando do descumprimento da legislação vigente para o setor. Além disso, o descaso com essa área é extremamente perigoso, visto que pode comprometer seriamente a saúde da população, que é a consumidora final dos insumos produzidos. Para melhorar essa situação, capacitação e atualização dos profissionais da área da saúde animal são fundamentais. Esses profissionais precisam adequar sua prática profissional às leis, decretos, instruções normativas e portarias vigentes, pois o cumprimento da legislação favorece a obtenção de uma maior qualidade dos produtos e, conseqüentemente, pode facilitar a entrada dos produtos brasileiros em mercados internacionais. Na rede mundial de computadores, pode-se encontrar todo tipo de informações em enormes quantidades, incluindo-se aí as legislações de todas as áreas de atuação humana. Porém, nem sempre é tarefa fácil localizar as informações de que se

necessita. Pensando em facilitar a busca e a recuperação de dados referentes à legislação da área agropecuária, foi desenvolvido um material eficiente e que incentiva a prática da consulta e do estudo, permitindo que os interessados se mantenham atualizados quanto às normas vigentes. Para atingir esses objetivos, grande parte da legislação agropecuária foi organizada no formato de um mapa mental interativo. O mapa mental é uma técnica gráfica que permite organizar ideias por meio de palavras-chave, cores e ilustrações, em uma estrutura que parte de um único centro do qual são irradiadas as informações de acordo com as relações que se pode estabelecer entre elas. Essa ferramenta, além de ser uma forma dinâmica de recuperação de informações e de aprendizagem, é de fácil manutenção e atualização. A facilidade de visualizar todo conteúdo das legislações de sanidade animal por meio de uma interface gráfica agiliza a busca por tópicos de interesse, poupa tempo e, ao mesmo tempo, desenvolve o aprendizado e/ou a atualização dos interessados. O grande mérito do mapa mental é que ele pode ser produzido de forma a articular informações sobre qualquer tema e tem como resultado uma forma de visualização que, apesar de sintética, é rica em informações.

Instituto de Tecnologia do Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775,
CEP 81350-010, Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: alinestrehl@gmail.com

Níveis de alertas de ocorrências zoossanitárias de um sistema automático de gerenciamento de informação*

Alert levels of zoosanitary events in an automated management system

Roxo, E.¹; Bersano, J. G.¹; Costa, S. M. F.²; Luquini, E.²; Irikura, D.^{**}; Souza, K. C.^{***}; Leite, L. O.³; Hellwig, H. O.³

O desenvolvimento de um sistema informatizado de gerenciamento de diagnósticos zoossanitários (Sizoo) tem como objetivo agilizar o gerenciamento de arquivo e comunicação de ocorrências entre o órgão gerador, o Instituto Biológico e o órgão efetor de medidas sanitárias oficiais, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária, ambos pertencentes à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, com a colaboração da Faculdade de Tecnologia de Carapicuíba, vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo. Esse sistema, idealizado para funcionar on-line sobre uma interface web, foi desenvolvido basicamente com softwares livres, na linguagem Java com recursos Java Script e CSS (*Cascading Style Sheets*), utilizando como banco de dados MySQL, permitindo, assim, grande mobilidade na criação de perfis de usuários, com diferentes níveis hierárquicos de acesso ao sistema. Uma das características inovadoras é o sistema de alertas zoossanitários automáticos por SMS e e-mail aos usuários previamente cadastrados no SIZOO. Esses alertas foram divididos em quatro níveis: 1) referente a patologias animais com baixa probabilidade de causar danos ao homem ou a outros animais; 2) patologias animais com poder limitado de propagação, capazes de causar danos individuais ao homem ou a outros animais, para as quais se dispõem de medidas profiláticas e/ou terapêuticas; 3) patologias animais com poder limitado de propagação, com alta capacidade de causar danos individuais ao homem ou a outros animais, para as quais se dispõem ou não de medidas profiláticas e/ou terapêuticas, mas que são de peculiar interesse do Estado, cuja notificação é compulsória num prazo máximo de 24 horas de seu diagnóstico; e 4) patologias animais emergentes, re-emergentes ou exóticas, cuja suspeita de ocorrência fundamentada em análises diagnósticas são de peculiar interesse do Estado e cuja notificação é compulsória e imediata. Assim, ao cadastrar as patologias no

sistema, essas respeitarão a classificação de risco conforme a legislação vigente e, quando de sua ocorrência, o sistema disparará os alertas de nível 3 e 4, comunicando, à revelia do responsável técnico, aos interessados competentes. Os alertas serão enviados simultaneamente a diferentes órgãos, de forma a agilizar a tomada de decisão sanitária, necessária a cada caso. Dessa forma, o sistema propiciará um recurso moderno e rápido, capaz de prover rastreabilidade e segurança das informações diagnósticas geradas pelo sistema oficial de sanidade animal do Estado de São Paulo.

*CNPq, Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008 Processo N°578241/2008-o Edital/Chamada: Linha 1 - Redes de Pesquisas Científicas, Tecnológicas de Inovação e Controle.

**Estagiário.

***Estagiário - Bolsista de ITI do CNPq.

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: roxo@biologico.sp.gov.br

²Faculdade de Tecnologia de Carapicuíba, Carapicuíba, SP, Brasil.

³Coordenadoria de Defesa Agropecuária, Campinas, SP, Brasil.

O uso da metodologia da problematização em um curso via web para a formação do médico veterinário especialista em sanidade animal

Using the methodology of problematization in a web based course for veterinarians

Malinowski, A.; Zuge, R.M.

Tendo em vista a premente necessidade de se aumentar a produção de produtos de origem animal para suprir as demandas das populações mundiais, faz-se necessária a formação de médicos veterinários que, além de tratar clinicamente dos animais, sejam capazes de estabelecer e gerenciar políticas públicas voltadas à sanidade animal com foco no controle, de zoonoses. As diretrizes curriculares nacionais dos cursos de medicina veterinária, publicadas em 2003 pelo Ministério da Educação e Cultura (MEC), destacam a importância da formação do médico veterinário de perfil crítico, reflexivo e criativo, que seja capaz de compreender e atuar sobre os determinantes complexos (sociais, culturais, comportamentais, econômicos etc.) que interferem na organização dos meios de produção no campo e, conseqüentemente, sobre a sua prática. Nesse sentido, o curso de pós-graduação em sanidade animal, que será ofertado na modalidade e-learning (via web), pretende trabalhar com a metodologia da problematização (MP), conforme proposta por Berbel. O objetivo de se utilizar a MP é fornecer subsídios para que o médico veterinário amplie sua visão para além da clínica médica e dos procedimentos meramente técnicos e pontuais e que desenvolva a capacidade de raciocínio lógico, de observação, de interpretação e de análise de informações e dados, com o intuito de identificar e propor alternativas para a solução de problemas. A MP difere da metodologia tradicional baseada na transmissão de conhecimento, na medida em que permite que o aluno construa conhecimento, reflita e atue sobre a sua realidade. Essa metodologia compreende as seguintes etapas: 1) observação da realidade – com a definição de um ou mais problemas a serem investigados; 2) identificação dos pontos-chaves – determinando aqueles que contribuem para a existência do(s) problema(s); 3) teorização – etapa na qual empenha-se na busca por apoio teórico para a compreensão do problema estudado; 4) hipóteses de solução – etapa na qual o aluno irá conceber alternativas criativas e viáveis para a solução do(s) problema(s) encontrado(s); 5) aplicação – momento em que o aluno irá propor a implementação de uma ou

mais das soluções que encontrou para resolver o problema na prática. A metodologia utilizada permitirá que o aluno construa conhecimento e reflita sobre a realidade da sua localidade, através da MP, o que lhe permitirá ver seu trabalho sob novas perspectivas, ajudando-o a construir uma nova prática, mais contextualizada e voltada para a pesquisa de novas soluções e para o desenvolvimento de novos saberes em medicina veterinária.

Instituto de Tecnologia do Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, CEP 81350-010, Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: amsantos@tecpar.br

Programa UFLA de Formação Continuada em Defesa Sanitária Animal - Prodesa/UFLA

UFLA Program in Continuing Education on Sanitary Animal Defense – Prodesa/UFLA

Rocha, C. M. B. M.¹; Janoele, F. C.^{1*}; Daher, D. O.^{1***}; Lopes, E.^{1****}; Silva, I. R. O.^{1****}; Bruhn, F. R. P.^{1*****}; Lucci, J. R.^{1*****}; Barbieri, J. M.^{1*****}

Com o objetivo de estruturação e implantação do programa UFLA de Formação Continuada em Defesa Sanitária Animal - Prodesa/UFLA financiado pelo edital 64/2008 CNPq/Mapa, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, estão sendo desenvolvidas ações, propostas e coordenadas por pesquisadores da UFLA, com participação de outras instituições (UFMG, IMA e Funed), que visam contribuir com a qualificação teórica de profissionais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), atuantes em defesa sanitária animal. Essas ações de treinamento estão sendo desenvolvidas em áreas estratégicas de defesa sanitária animal em dois cursos de especialização *lato sensu* a distância em defesa sanitária animal *in company* de longa duração, em andamento, para 150 servidores designados pelo Mapa e atuantes do Serviço de Defesa Sanitária Animal. As disciplinas que formam o currículo do curso guardam relação com eixos temáticos de defesa agropecuária, como as áreas de vigilância, sanidade animal e métodos epidemiológicos. Foi criado um regulamento interno para os cursos de especialização *lato sensu* em defesa sanitária animal *in company* edital 64/2008 CNPq/Mapa, para contribuir para a melhoria da qualidade dos cursos de especialização à distância. Foram estabelecidas as normas dos cursos, dentre essas, as relacionadas à elaboração e apresentação dos trabalhos de conclusão dos cursos (TCC). Os TCC poderão ser apresentados nas formas: estudo de caso, artigo científico, boletim técnico ou de extensão, projeto de pesquisa ou extensão que visem contribuir significativamente para o desenvolvimento científico e tecnológico e inovação do País e portfólio de material didático. Este último tem por finalidade estimular a produção de material didático e de divulgação que possam ser utilizados futuramente pela Universidade Federal de Lavras nos cursos de graduação e de pós-graduação. O projeto vem reforçando a parceria entre o Mapa e a Universidade Federal de Lavras na área de defesa animal, além de estabelecer, de forma contínua, um treinamento qualificado para essa área.

*Bolsista de extensão/UFLA.

**Bolsista DTI-II/CNPq – edital 64/Mapa.

***Bolsista ATP-A-A/CNPq – edital 64/Mapa.

****Bolsista de mestrado-Capes.

*****Bolsista CNPq/Pibic/UFLA.

*****PIBIC/FAPEMIG.

Apoio financeiro: CNPq, Fapemig, Capes, UFLA e Mapa.

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária, CP 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.
E-mail: rocha@dmv.ufla.br

Comparação entre as técnicas laboratoriais: IGDA, ELISA, PCR e histopatologia no diagnóstico de LTI em um surto de aves poedeiras

Comparison of diagnostic techniques: ELISA, IDGA, PCR and histopathology of infectious laryngotracheitis from layers hens

Buim, M. R.¹; Luciano, R. L.²; del Fava, C.³; Ikuno, A. A.³; Ferreira, A. J. P.⁴; Yshizuka, M.⁵; Garcia, M.⁶; Buchala, F. G.⁷; Soares N. M.¹

O vírus da laringotraqueíte é um patógeno de galinhas, classificado como herpesvírus. O diagnóstico clínico é sugestivo e se complementa com a confirmação laboratorial da enfermidade. As medidas preventivas e profiláticas são importantes para que se evite a rápida disseminação da infecção, que tem características multifatoriais. Neste trabalho foram relatados os resultados obtidos pela investigação epidemiológica de um surto de LTI no município de Guataporá, Estado de São Paulo, Brasil, executada pela equipe do Programa Oficial de Controle e Erradicação de LTI no Estado de São Paulo. Essa equipe de caráter multidisciplinar desenvolve um projeto de capacitação técnica, financiado pelo Mapa. O projeto consiste no estabelecimento de intercâmbio técnico e científico entre os profissionais da Superintendência Federal de Agricultura do Estado de São Paulo/Mapa, da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (do Instituto Biológico e da Coordenadoria de Defesa Agropecuária) e os professores do Centro de Referência Internacional de Pesquisa e Diagnóstico das Doenças Aviárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Geórgia (PDRC-UGA). Tem o sentido de desenvolver os procedimentos e capacitar os profissionais e pesquisadores envolvidos nas práticas laboratoriais, monitoramento sanitário e interpretação dos resultados referentes ao diagnóstico da Laringotraqueíte Infecciosa das Aves. Um total de 19 lotes suspeitos foi amostrado e o diagnóstico laboratorial foi realizado e comparado entre

técnicas sorológicas (ELISA e IDGA), histopatologia e diagnóstico molecular (PCR). O diagnóstico clínico também foi realizado nos lotes de poedeiras avaliados, evidenciado pelos sinais respiratórios e aumento de mortalidade das aves. Dentre as provas de detecção de anticorpos, o ELISA foi a mais sensível, detectando positividade em 100% dos lotes, enquanto a IGDA não detectou qualquer lote positivo (0,0%) revelando baixíssima sensibilidade analítica do teste. A PCR utilizando o gene ICP4 (688bp) detectou DNA viral em 63,2% do raspado traqueal. As lesões inflamatórias observadas no histopatológico (tecido emblocado em parafina e coloração hematoxilina/eosina) da mucosa laringotraqueal, caracterizadas por infiltrado inflamatório linfoplasmocítico, associado à presença de sincício e inclusão intranuclear eosinofílica, foram observadas em 57,9% das amostras. Apesar da positividade simultânea (42%) ao ELISA, PCR e histopatologia, observou-se complementaridade entre as três técnicas. A presença de lesões teciduais sugestivas do LTI demonstrou a presença de infecção ativa em cerca de metade dos lotes examinados. Destaca-se que a IGDA não foi um teste eficiente na detecção da LTI nesse surto, podendo estar relacionada à baixa sensibilidade analítica, à variabilidade antigênica das cepas de campo ou a alguma outra causa não elucidada.

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos
Av. Gaspar Ricardo, 1700, CEP 17690-000, Bastos, SP, Brasil.

E-mail: marcosbuim@biologico.sp.gov.br

²Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Descalvado, SP, Brasil.

³Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, Laboratório de Ornitopatologia, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Comite Estadual de Sanidade Avícola, Campinas, SP, Brasil.

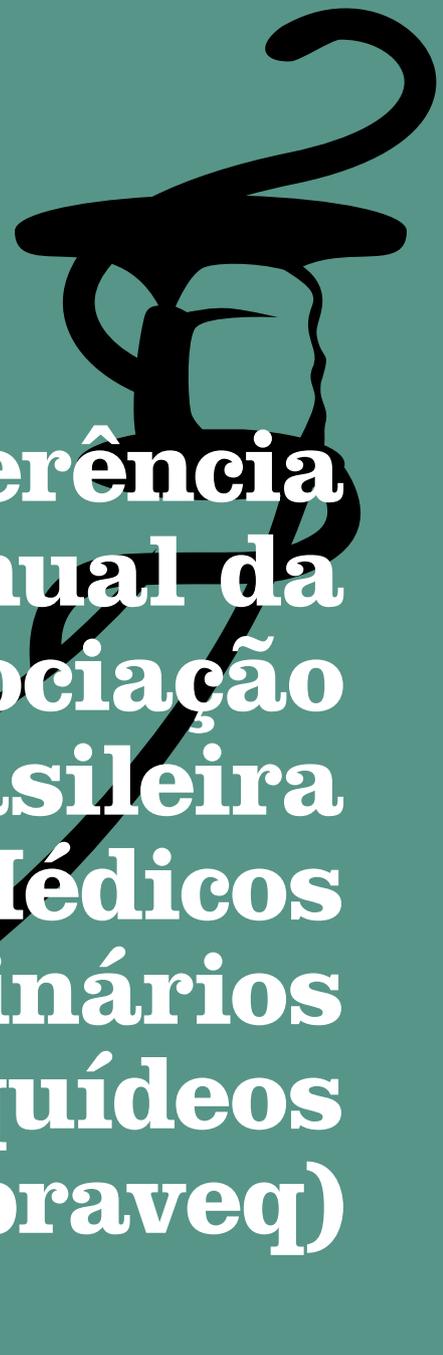
⁶University of Georgia, College of Veterinary Medicine, Poultry Diagnostic and Research Center, Athens, GA, USA.

⁷Coordenadoria de Defesa Sanitária Animal, Campinas, SP, Brasil.





**XII Conferência
Anual da
Associação
Brasileira
de Médicos
Veterinários
de Equídeos
(Abraveq)**



Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião¹

Introdução

Os profissionais que trabalham com transferência de embriões em equinos devem ser capazes de identificar e avaliar adequadamente os embriões. A avaliação do estágio de desenvolvimento, da qualidade e do tamanho dos embriões é fundamental e a capacidade de diferenciar embriões de ovócitos não fertilizados (UFOs) e estruturas não embriônicas que possam vir a ser coletadas durante o procedimento de lavagem também é importante.

O objetivo deste artigo é revisar os estágios de desenvolvimento do embrião equino e a sua classificação quanto ao escore de qualidade ou grau.

Materiais e métodos

A detecção de um embrião na placa deve ser seguida de um procedimento sistemático de avaliação. Esse procedimento costuma ser rápido, mas há ocasiões em que a diferenciação entre um embrião, um ovócito não fertilizado e uma estrutura não embriônica pode levar vários minutos. A avaliação deve englobar o estágio de desenvolvimento, o escore de qualidade (grau) e o tamanho.

Um microscópio de boa qualidade, munido de um micrômetro para mensuração do diâmetro

do embrião, é fundamental para uma avaliação adequada. Antes da avaliação, os embriões são lavados em 3 ou mais gotas de meio de lavagem ou meio de manutenção. O fluido inicial de lavagem contido na placa pode ter uma quantidade significativa de debris celulares e o objetivo é transferir o embrião deste meio inicial, removendo sequencialmente a maior quantidade possível de debris durante o procedimento de lavagem. Uma vez concluído o procedimento de lavagem, o embrião é mantido no meio de manutenção e avaliado antes da sua transferência, transporte para outro local para transferência futura ou criopreservação.

Foi realizada uma análise retrospectiva do escore de qualidade ou grau de 623 embriões coletados no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade do Colorado.

Resultados

Os estágios de Desenvolvimento do embrião equino estão dispostos na **Tabela 1**.

Ovócitos não fertilizados se caracterizam por apresentarem diâmetro entre 125 e 150 µm e zona pelúcida espessa, podendo ter formato arredondado ou oval, embora sejam planos e não rolem quando manipulados (diferente do embrião). O citoplasma dessa estrutura unicelular pode se apresentar degenerado ou fragmentado, parecendo-se vagamente com os blastômeros de uma mórula. O ovócito não fertilizado geralmente fica retido no oviduto, próximo

¹ Palestra apresentada na XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abraveq), realizada em 11 e 12 de junho de 2011 no Royal Palm Plaza Resort, em Campinas (SP).

à junção ampulo-ístmica (BETTERIDGE, 1989; Weber et al., 1991), e costuma ser encontrado durante o procedimento de lavagem somente quando transportado através da junção útero-tubárica junto com um embrião viável (STEFFENHAGEN et al., 1972).

Estruturas não embriônicas como debris celulares, cristais de urina, matéria orgânica e outros debris podem eventualmente ser recuperadas durante as tentativas de coletas de embriões. A diferenciação entre tais estruturas

e um embrião se baseia na presença ou ausência da zona pelúcida, em seu tamanho e em seu formato.

Atualmente, empregamos um sistema de graduação modificado baseado em 4 pontos para a avaliação de embriões equinos na Universidade do Colorado (MCKINNON et al., 1988; VANDERWALL, 1996). As características empregadas na determinação do escore de qualidade ou grau são: 1) formato do embrião (esférico, oval, colapsado etc.); 2) espessura da zona pelúcida;

ESTÁGIO	TAMANHO (μM)	DESCRIÇÃO
Mórula	150 a 200 μm	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores; borda externa dos blastômeros de aparência "serrilhada"; possibilidade de identificação do espaço perivitelinico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento à manipulação (Figura 1).
Blastocisto inicial	150 a 250 μm	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros; mínimo espaço perivitelinico, tamanho semelhante ao da mórula (Figura 2).
Blastocisto	150 a 300 μm	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina (Figura 3).
Blastocisto Expandido	300 to > 1,000 μm	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade (Figura 4).
Ovócito não fertilizado (UFO)	125 a 150 μm	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola à manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados (Figura 5).

TABELA 1 – Estágios de Desenvolvimento do Embrião Equino



Figura 1 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de mórula.

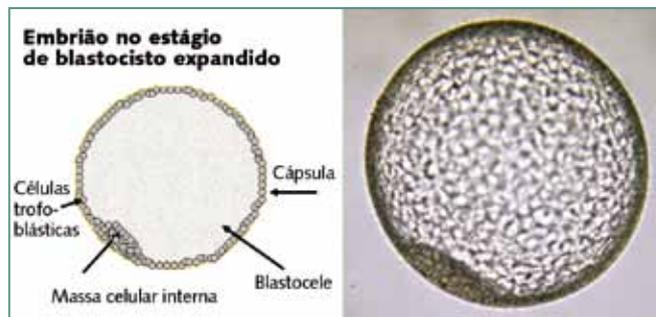


Figura 4 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto expandido.

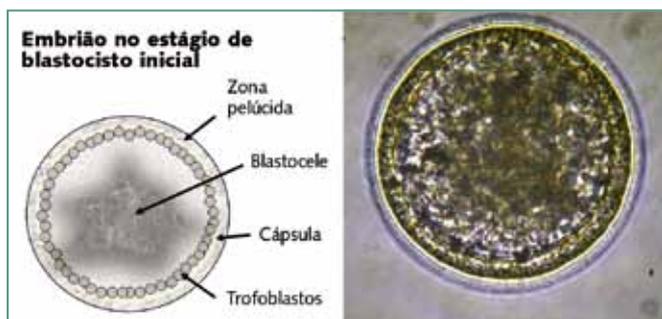


Figura 2 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto inicial.

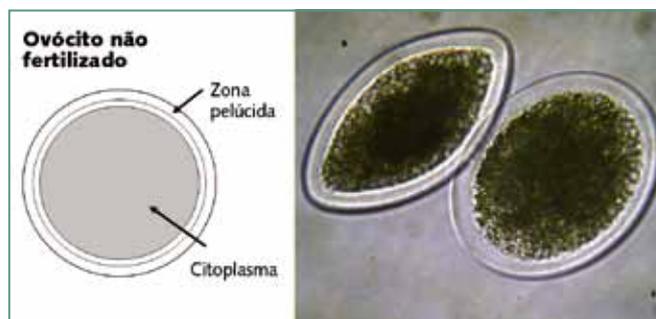


Figura 5 – Par de ovócitos não fertilizados.

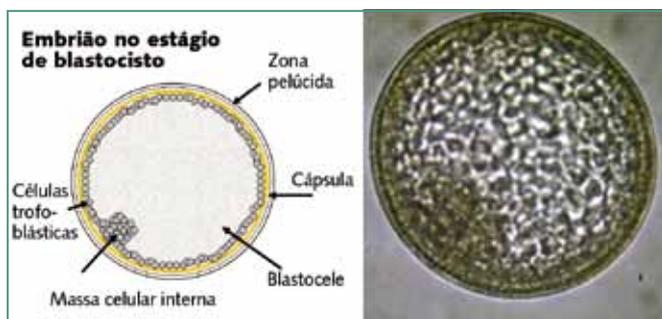


Figura 3 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível.

3) uniformidade dos blastômeros (tamanho, cor, estrutura); 4) presença/ausência de blastômeros extrusados ou degenerados; 5) compactação dos blastômeros; 6) grau de granulação ou fragmentação citoplasmática; 7) presença/ausência e tamanho do espaço perivitelínico; 8) sinais de desidratação ou enrugamento do embrião; 9) presença/ausência de anomalias da blastocele; 10) presença/ausência de lesão da zona pelúcida ou cápsula (Tabela 2).

GRAU	COMENTÁRIO	DESCRIÇÃO
1	Excelente	Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação (Figuras 1 a 4).
2	Bom	Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula (Figuras 6 e 7).
3	Ruim	Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula (Figura 8).
4	Degenerado ou Morto	Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião.
UFO	UFO	Ovócito não fertilizado

TABELA 2 – Graduação do embrião de acordo com um sistema de 4 pontos

A aderência de vários agregados celulares ou outro material à zona pelúcida pode indicar endometrite da égua doadora ou contaminação do procedimento de lavagem. A presença de debris aderidos ao exterior do embrião nem sempre influencia a graduação, embora a sua presença seja muito importante do ponto de vista clínico e deva ser registrada.

A grande maioria (95,5%) dos 623 embriões coletados em nossa clínica durante um período de 4 anos era de qualidade boa ou excelente (**Tabela 3**).

Discussão

A grande maioria dos embriões equinos coletados é de qualidade boa ou excelente, provavelmente devido ao transporte seletivo de embriões viáveis através do oviduto (Weber et al., 1991). Embriões de má qualidade, embriões mortos e ovócitos não fertilizados costumam ficar retidos no oviduto.

A recuperação de embriões menores e/ou em um estágio de desenvolvimento mais precoce do que o esperado é comum em éguas mais velhas ou em éguas inseminadas com sêmen congelado e pode refletir atraso no desenvolvimento embrionário, inadequação do ambiente ovidutal ou uterino, ou outros fatores. A identificação do atraso do desenvolvimento embrionário é importante, uma vez que as taxas de prenhez podem ser otimizadas quando o embrião é transferido para uma égua sincronizada de acordo com desenvolvimento embrionário e não com a data da ovulação da égua doadora.

O encontro de um ovócito não fertilizado junto com um embrião viável em um lavado uterino é comum e mais frequente do que na ausência de embriões. Nessas circunstâncias, devemos considerar a probabilidade da presença de um embrião viável no útero ou no oviduto da égua, cuja recuperação pode ser obtida pela repetição da lavagem.

Conclusão

A capacidade de avaliar corretamente o estágio de desenvolvimento embrionário, a qualidade e o tamanho do embrião é fundamental para o sucesso do programa de transferência de embriões em equinos e recomenda-se o emprego de um método sistemático de avaliação, além do registro de todos os embriões, se possível com imagens fotográficas, e do sucesso das transferências. A seleção da égua receptora adequada, a estimativa da possibilidade de sucesso da transferência e a capacidade de determinar se o embrião se presta à criopreservação dependem da sua correta avaliação.

GRADUAÇÃO DO EMBRIÃO	EMBRIÕES	
	NÚMERO	%
1,0 a 1,5	470	(75,4 %)
2,0 a 2,5	125	(20,1 %)
3,0 a 3,5	26	(4,2 %)
4,0	2	(0,3 %)
Total	623	(100 %)

TABELA 3 – Embriões de equinos segundo a graduação da qualidade

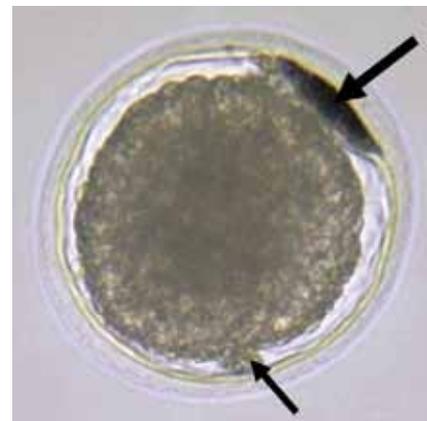


Figura 6 – Embrião de grau 2 no estágio de blastocisto inicial; presença de blastômeros extrusados (setas).



Figura 7 – Embrião de grau 3 no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas).

Referências

1. Betteridge, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. In: *Equine Vet J*, 1989. Suppl 8. p. 92-100.
2. Weber, J. A.; Freeman, D. A.; Vanderwall, D. K. et al. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. In: *Biol Reprod*, 1991. 45. p. 540-543.
3. Steffenhagen, W. P.; Pineda, M. H.; Ginther, O. J. Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. In: *Am J Vet Res*, 1972. 33. p. 2391-2398.
4. McKinnon, A. O.; Squires, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc*, 1988. 192. p. 401-406.
5. Vanderwall, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. In: *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1996. 12. p. 61-83.

Princípios de tratamento de lesões tendíneas e ligamentares¹

Introdução – fundamentos dos tratamentos

A lesão tendínea desencadeia uma resposta fibrótica que restaura a força da estrutura lesada. Entretanto, do ponto de vista funcional, esse fibrosamento é inferior ao tendão normal por vários motivos. O tecido cicatricial, por ser mais fraco que o tendão ou o ligamento, é depositado em maiores quantidades, resultando em maior rigidez estrutural. Essa funcionalidade inferior resulta em queda do desempenho e em risco substancial de recorrência da lesão – mais de 50% dos cavalos de corrida que retomam a atividade plena sofrem recorrência da lesão dentro de dois anos, apesar da disponibilidade de uma ampla gama de tratamentos (DYSON, 2004). Os objetivos do tratamento são específicos para cada fase da cicatrização – aguda (inflamatória), subaguda (fibroplástica) e crônica (remodelação).

Fase aguda (inflamatória)

A lesão clínica resulta em ruptura da matriz tendínea e em hemorragia, desencadeando uma resposta inflamatória acentuada, que dura vários dias e se volta para a eliminação do tecido lesado. Esta fase se caracteriza pela

presença dos sinais clássicos de inflamação (calor, dor/ claudicação e edema) e pela hiperemia intensa, com aporte de células de defesa (inicialmente neutrófilos e em seguida macrófagos e monócitos) e liberação de enzimas proteolíticas. Na maioria dos casos, a resposta inflamatória é considerada excessiva e as enzimas liberadas continuam destruindo as porções menos afetadas do tendão. Uma vez que o tecido cicatricial que se forma após a lesão é funcionalmente inferior ao tecido tendíneo, a instituição rápida de tratamento anti-inflamatório agressivo favorece a preservação do tendão “normal”.

Objetivo do tratamento – controle da inflamação

Opções de tratamento

A **fisioterapia** (repouso, aplicação de frio e bandagens compressivas) continua sendo o aspecto mais simples e mais importante do tratamento precoce. Logo após a lesão, deve-se iniciar a aplicação de frio por 20 minutos. A hidroterapia a frio é mais eficiente e segura do que a aplicação de gelo e diversos dispositivos podem ser usados para promover a aplicação concomitante de frio e pressão. A mobilização passiva controlada também pode ser útil, mesmo na fase

¹ Palestra apresentada na XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abraveq), realizada em 11 e 12 de junho de 2011 no Royal Palm Plaza Resort, em Campinas (SP).

precoce, e tem por objetivo o controle da inflamação, a maximização da cicatrização intrínseca e manutenção da amplitude de movimento.

O manejo farmacológico inclui a administração de **esteroides de curta duração** nas primeiras 24 a 48 horas (depois desse período, tais drogas podem comprometer a resposta fibroblástica) e a aplicação intralesional de **glicosaminoglicanas polissulfatadas**, capazes de inibir a ação das enzimas proteolíticas *in vitro*. Estudos recentes, empregando um modelo experimental de tendinite, demonstraram que estas últimas drogas melhoram a organização da cicatriz tendínea, quando comparadas com solução fisiológica. A aplicação local de DMSO pode ajudar a acelerar a resolução do edema.

Nesta fase, o tratamento cirúrgico se baseia na **ruptura tendínea percutânea longitudinal** (“*splitting*”), que acelera a resolução das lesões vacuolares (“*core lesions*”), conforme demonstrado por ultrassonografia. A técnica pode ser realizada com um bisturi ou, de forma menos invasiva, através de punção com agulha, método que pode ser combinado com a medicação intratendínea.

Fase subaguda (fibroblástica)

Logo no início da lesão e sobrepondo-se à fase inflamatória, verifica-se a ocorrência de angiogênese e

invasão por fibroblastos, levando à formação de tecido cicatricial durante várias semanas, a fim de substituir o tecido lesado. O tecido cicatricial é composto por colágeno dos tipos I e III e seu arranjo é mais desorganizado do que o das fibrilas Tipo I do tendão normal, longitudinalmente alinhadas. Isso prejudica a ação de mola do tendão e predispõe à recorrência da lesão.

Objetivo do tratamento – estímulo da fibroplasia e otimização da organização e funcionalidade do tecido cicatricial

Opções de tratamento

A **mobilização progressiva precoce** (exercício ao passo) e a **monitoração ultrassonográfica regular** são empregadas para melhorar a qualidade do tecido cicatricial que se forma durante esta fase. Sem dúvida, o principal progresso na recuperação de lesões tendíneas decorreu do emprego da ultrassonografia como ferramenta de reabilitação. A ultrassonografia de referência, realizada pelo menos 4 a 7 dias após a lesão, fornece informações prognósticas e pode ser usada para mensurações subsequentes da área de secção transversal, que representam uma forma semiobjetiva de avaliação da cicatrização tendínea. Antes de permitir que o cavalo passe para o próximo nível do

programa de exercício controlado, o tendão deve estar estável ou apresentar redução da área de secção transversal (aumento da área de secção transversal < 10% em qualquer nível) em relação ao exame prévio, além de apresentar melhora do padrão de ecogenicidade e disposição das fibras. Há grande variação individual de velocidade de evolução da lesão. Muitos cavalos ficam indóceis quando trabalham apenas ao passo e devem ser colocados no andador.

A injeção intratendínea de **beta-fumarato de aminopropionitrila (BAPTEN™)** entre 30 e 90 dias após a lesão foi empregada para tentar melhorar a qualidade do tecido cicatricial. Essa droga inibe a enzima lisil-oxidase, responsável pelas ligações cruzadas das moléculas de colágeno, e, quando associada ao exercício controlado, promove a melhora do alinhamento longitudinal das fibras colágenas. Após o término do seu efeito, a ligação cruzada ocorre, aumentando a força da cicatriz. Embora os ensaios iniciais, realizados nos EUA e na Grã-Bretanha, tenham indicado bons resultados em casos severos, estudos experimentais mais recentes não mostraram melhora significativa da cicatrização tendínea. Além disso, a droga reduz a síntese de colágeno nas células tendíneas *in vitro* e não está mais disponível no mercado enquanto fármaco de uso licenciado.

Outras drogas, como o **hialuronato de sódio**, foram usadas em aplicações intratendíneas e peritendíneas, com resultados conflitantes, embora efeitos benéficos relacionados à redução da formação de aderências em lesões tendíneas localizadas no interior de bainhas sinoviais tenham sido demonstrados experimentalmente.

Rupturas nas margens de tendões e ligamentos contidos em cavidades sinoviais (bainhas tendíneas ou articulações) costumam ser responsáveis por episódios recorrentes de tenossinovite ou sinovite. Na ausência de patologias intratendíneas significativas (tendinopatias verdadeiras), muitas dessas rupturas passam despercebidas na ultrassonografia. Uma vez que o ambiente sinovial limita o processo cicatricial, acredita-se que a debridação dessas lesões por tenoscopia possa melhorar a sua cicatrização, embora a fase reparativa subsequente continue sendo lenta e muitas vezes incompleta. A ruptura da *manica flexoria* tem prognóstico melhor devido à possibilidade de remoção completa da estrutura, sendo o pior prognóstico reservado às rupturas que envolvem o tendão flexor digital profundo.

A **terapia por ondas de choque extracorpórea** é empregada principalmente no tratamento da desmíte crônica (mais de 3 meses de evolução) do ligamento

suspensório. Embora seu uso em lesões tendíneas tenha sido sugerido, dados experimentais recentes revelam a indução de lesão significativa nessas estruturas, o que desaconselha o emprego da técnica para tratamento de tendinites, pelo menos da tendinite do tendão flexor digital superficial.

Uma abordagem alternativa que pode ser empregada para restaurar a funcionalidade de tendões jovens normais é provocar a sua regeneração, em vez de sua cicatrização com tecido fibroso. A medicina regenerativa emprega um ou mais de três componentes distintos – arcabouço, fator anabólico (fator de crescimento, por exemplo) e fonte celular. Além disso, acredita-se que a existência de um ambiente mecânico adequado, proporcionado pela instituição de um programa de exercício controlado após o tratamento, seja essencial para otimizar a regeneração. Cada um desses componentes constitui uma forma de terapia para tratamento de lesões tendíneas e ligamentares em equinos, a ser abordada em palestra separada.

Fase crônica (remodelação)

Inicialmente, o tecido cicatricial depositado é relativamente fraco e o aumento rápido do nível de exercício pode levar à recorrência da lesão no mesmo local. Ao longo dos meses, esse tecido cicatricial imaturo se remodela e o colágeno Tipo III é gradativamente transformado em colágeno Tipo I, o que se reflete em aumento da força e da rigidez. Entretanto, o tendão nunca recupera suas propriedades mecânicas originais, permanecendo sempre susceptível a novas lesões.

Objetivo do tratamento – otimização da funcionalidade do tecido cicatricial para prevenir a recorrência da lesão

Opções de tratamento

A combinação de um **programa progressivo de exercício controlado** com a **avaliação ultrassonográfica regular** para a detecção precoce de sinais de recorrência é o tratamento ideal da tendinite crônica. Como regra geral, recomenda-se apenas exercício no andador nos primeiros 3 meses, após a regressão da inflamação. Em seguida, o trote é introduzido, prosseguindo-se para o galope lento após 6 meses.

A **desmotomia do ligamento acessório do TFDS** pode ser realizada para transferir a elasticidade de músculo flexor digital superficial para o tendão em recuperação, reduzindo a tensão máxima sobre o mesmo. A desmotomia bilateral foi advocada em

equinos para prevenir a recorrência da tendinite do TFDS em qualquer dos membros afetados, após o período de recuperação. Além da abordagem tradicional aberta, a cirurgia pode ser feita por tenoscopia através da bainha carpiana e costuma ser realizada junto com a ruptura tendínea percutânea longitudinal, na fase precoce da tendinite. Entretanto, o efeito benéfico sugerido inicialmente não se confirmou em outros estudos e dados epidemiológicos recentes indicam que cavalos tratados com essa técnica são mais predispostos à desmiste do ligamento suspensório.

A prevenção da hiperextensão da articulação metacarpofalangeana é uma outra forma de reduzir o risco

de novas lesões e pode ser obtida submetendo-se o cavalo a um **nível mais baixo de exercícios**, embora a exigência de se retornar o animal ao nível prévio de desempenho seja comum. A nova bota (Equstride), ainda não disponível no mercado, parece ser capaz de evitar a hiperextensão da articulação metacarpofalangeana, prevenindo assim a recorrência.

Referências

1. Avella, C.; Smith, R. K. W. Diseases of tendons and ligaments. In: AUER, Stick (Org.). *Equine Surgery*. 3rd edition. Chapter 86, 2006. p. 1086-1111.

Patofisiologia das lesões tendíneas e ligamentares¹

Introdução – o impacto da doença

Lesões tendíneas são comuns em todas as atividades atléticas, tanto em humanos como em equinos. Estudos epidemiológicos abordando a incidência de lesões ortopédicas equinas sofridas em pistas de corrida mostram apenas a “ponta do iceberg”, uma vez que grande parte das lesões tendíneas ocorre durante o treinamento e, muito raramente, no pasto. Um estudo ultrassonográfico de cavalos em treinamento (*National Hunt*) mostrou que quase um quarto (23%) dos animais apresentam sinais de patologia tendínea, com índices próximos de 50% em algumas cocheiras. Isso representa um ônus elevado para o setor equino, tanto do ponto de vista financeiro quanto do ponto de vista de conscientização do público.

Estrutura, função e fisiologia do tendão normal

Os tendões, embora descritos como estruturas que transmitem as forças da musculatura para o osso, podem ser classificados em 2 tipos genéricos – tendões posturais rígidos (como os tendões da mão humana e o tendão extensor

digital comum equino), que se enquadram na descrição clássica, e tendões de sustentação do peso, mais elásticos (como o tendão de Aquiles humano, o tendão flexor digital superficial (TFDS) e o ligamento suspensório (LS) equinos). O TFDS (e o LS) não age apenas dando sustentação à articulação metacarpofalangeana, mas também armazenando energia para uma locomoção eficiente – ou seja, age como uma mola. A contração máxima do músculo flexor digital superficial é de aproximadamente 2 mm e sua principal função é a fixação da origem do TFDS, além da absorção de oscilações de alta frequência potencialmente nocivas.

Os equinos não poderiam correr em velocidade tão alta e por distâncias tão grandes sem a elasticidade tendínea. Infelizmente, essa função tem um preço, traduzido em aplicação de cargas muito altas durante o galope (uma carga de 1 a 2 toneladas é aplicada sobre o TFDS, cuja espessura é de apenas 1 cm²) e grande amplitude de alongamento, chegando a 16% (em laboratório, a ruptura do TFDS ocorre sob alongamentos de 12 a 20%). Isso significa que o TFDS trabalha muito próximo do seu limite de tolerância, o que o predispõe a lesões.

A composição e a organização da matriz tendínea determinam suas propriedades elásticas funcionais ideais, embora os fatores que promovem a formação desse sistema de sintonia fina ainda não sejam bem

¹ Palestra apresentada na XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abraceq), realizada em 11 e 12 de junho de 2011 no Royal Palm Plaza Resort, em Campinas (SP).

Professor Roger K.W. Smith ²

Hawkshead Lane, North Mymms, Hatfield, Herts. AL9 7TA
✉ rksmith@rvc.ac.uk
Departamento de Clínica Veterinária
The Royal Veterinary College

conhecidos. Pesquisas recentes trouxeram muitas informações sobre a estrutura e a função tendínea normais, que vêm nos ajudando a entender a fisiologia do tendão e o mecanismo de ocorrência das lesões induzidas por estiramento. Tais informações se revestem de importância na prevenção dessas lesões – uma estratégia importante frente aos resultados insatisfatórios dos métodos disponíveis de tratamento.

A matriz extracelular é o componente predominante dos tendões e ligamentos, com pequena contribuição das células tendíneas ou tenócitos. O principal componente dessa matriz é a água (60 a 70%), sendo que 80% da matéria seca são compostas por **colágeno**, notadamente na forma de fibrilas colágenas Tipo I, dispostas em um arranjo hierárquico de feixes ou fascículos de fibrilas primárias, secundárias e terciárias. Outros tipos de colágeno participam da composição do tendão e estão associados a funções específicas; um exemplo é o colágeno Tipo II (o colágeno presente na cartilagem), que se concentra nas regiões onde o tendão passa sobre proeminências ósseas e muda de direção, sofrendo compressão. Quando relaxadas, as fibras colágenas apresentam um padrão ondulado conhecido como “*crimp*”. Este arranjo, combinado com a organização helicoidal das fibrilas colágenas primárias e possivelmente com a ligação cruzada das proteínas não colágenas, confere elasticidade ao tecido.

Outros componentes da matriz extracelular que vêm recebendo atenção nas pesquisas tendíneas, devido aos seus efeitos sobre a organização das fibrilas colágenas, ao seu papel na remodelação da matriz extracelular e ao seu potencial como “marcadores” de lesões tendíneas, são as **proteínas não colágenas**, embora participem apenas dos 20% de matéria seca. Uma dessas proteínas, a Proteína Oligomérica da Matriz Cartilaginosa (COMP), uma glicoproteína grande que se acreditava ser restrita à cartilagem, é encontrada em grandes quantidades (até 3%), na matéria seca do tendão jovem e é a segunda proteína mais abundante no TFDS, depois do colágeno. Os níveis de COMP têm relação com a função tendínea, sendo maiores nos tendões de sustentação do que nos tendões posturais. A concentração de COMP aumenta na região metacarpiana do TFDS durante o crescimento e depois declina, embora se mantenha elevada nas regiões de maior compressão tendínea. Sua função exata não é conhecida, mas acredita-se que tenha papel importante nos eventos precoces relacionados à formação das fibrilas colágenas, com possível influência sobre a “qualidade” da matriz em formação. Estudos recentes demonstraram uma correlação entre a força mecânica e os níveis de COMP em tendões maduros, reforçando esta hipótese.

O papel dos **tenócitos** nos tendões e ligamentos equinos ainda não foi totalmente esclarecido. A morfologia das células examinadas à microscopia de luz muda com a idade,

² Professor de Ortopedia Equina

possivelmente refletindo o declínio da atividade metabólica no tendão maduro. No tendão flexor digital adulto, a maioria dos núcleos celulares é fusiforme, o que indica uma menor atividade de síntese. Pesquisas recentes mostraram que os tenócitos, inclusive os dos tendões equinos, possuem grande quantidade de extensões citoplasmáticas que interagem com as células vizinhas, formando um sincício de células intercomunicantes capazes de responder a um estímulo como um único órgão. O desenvolvimento tendíneo fetal precoce parece derivar desse sincício interativo de células secretórias e pequenas fibrilas colágenas em organização, através de extensões citoplasmáticas especializadas (“fibropositoras”). Após o nascimento, as fibrilas colágenas aumentam de tamanho devido ao acréscimo de moléculas colágenas secretadas pelos tenócitos às pequenas fibrilas colágenas paralelas – conceito este chamado de “semeadura e nutrição” (“*seed and feed*”) –, dando origem ao alinhamento paralelo dos feixes de fibras colágenas, característico da estrutura tendínea.

O **suprimento sanguíneo** dos tenócitos deriva de fontes intratendíneas e extratendíneas. O tendão flexor digital superficial possui um suprimento sanguíneo intratendíneo proeminente, com mínima contribuição dos vasos paratendíneos. Os tendões também são irrigados por vasos que penetram através de seus pontos de origem e inserção. No interior de bainhas sinoviais, o suprimento sanguíneo extratendíneo é fornecido por vasos sanguíneos intermitentes, que têm acesso ao tendão através de diversas inserções em tecidos moles (mesotendão). A nutrição dos tenócitos ocorre por perfusão sanguínea e difusão de nutrientes a partir do líquido sinovial contido nas bainhas tendíneas. No equino, dado o tamanho dos tendões, acredita-se que a contribuição deste segundo mecanismo seja mínima. O suprimento sanguíneo do tendão flexor digital superficial equino é surpreendentemente alto, assemelhando-se ao do músculo esquelético em repouso, segundo estudos realizados com clearance radioativo. A resposta ao exercício é menos previsível. Enquanto alguns estudos mostram aumento mínimo do fluxo sanguíneo, outros relatam aumentos da ordem de quase três vezes em relação ao tendão em repouso, o que pode refletir o efeito do treinamento ou pré-condicionamento. O suprimento sanguíneo aumenta dramaticamente em ambos os membros após a lesão, indicando que esta raramente afeta um único membro, embora o quadro possa parecer unilateral do ponto de vista clínico.

Patogênese da lesão por estiramento excessivo

As lesões tendíneas podem decorrer de fatores intrínsecos (estiramentos) ou extrínsecos (perfurações e

lacerações), além de deslocamentos. As lesões intrínsecas, ou lesões por estiramento, são mais frequentes e afetam principalmente os tecidos moles palmares que dão sustentação à articulação metacarpofalangeana, notadamente o tendão flexor digital superficial (TFDS) e o ligamento suspensório (LS), embora também afetem o ligamento acessório do tendão flexor digital profundo (LATFDP).

As lesões por estiramento excessivo decorrem da hiperextensão repentina da articulação metacarpofalangeana, que ultrapassa a força do tendão. Entretanto, atualmente se acredita que a forma mais comum de lesão decorra de uma fase precedente de degeneração tendínea. Uma vez que o TFDS trabalha muito perto de seu limite funcional, perdas mínimas de força podem aumentar muito o risco de tendinite clínica.

Em princípio, todos os tendões possuem composição semelhante ao nascimento (o conceito de tendão “sem memória”, imitando a situação da cartilagem). Entretanto, a aplicação de carga subsequente e possivelmente os fatores de crescimento agem sobre a matriz, determinando o crescimento e as características mecânicas funcionais ideais. A anisotropia ocorre nas áreas sob compressão, que desenvolvem matriz semelhante à da cartilagem, e os dois tipos de tendão divergem quanto à composição e propriedades mecânicas. A investigação dos efeitos da idade, da função e do exercício foi objeto de diversos estudos experimentais envolvendo exercícios e análise tendínea *post mortem*. No tendão jovem e imaturo, a aplicação de carga parece estimular a produção de matriz, efeito que se perde em grande parte após a maturidade esquelética. Em adultos, as propriedades mecânicas não diferem significativamente de acordo com a idade ou o exercício, embora haja grande variância. O comprimento e o ângulo da ondulação das fibrilas colágenas são reduzidos na porção central com o exercício e a idade, que agem de forma sinérgica. Diferenças regionais de diâmetro das fibrilas colágenas da matriz foram observadas em equinos mais velhos exercitados por longos períodos, mas não por curtos períodos ou em equinos mais jovens. A maior proporção de fibrilas pequenas na região central do tendão dos animais exercitados por longos períodos de tempo parece resultar da desagregação das fibrilas de diâmetro maior, uma vez que não houve correlação com a neoformação de colágeno. Além disso, nesses animais foi observada uma perda de glicosaminoglicanas e de COMP na região central do tendão, ponto preferencial de ocorrência das lesões clínicas.

Com base nos resultados desses estudos, acredita-se que a região do 1/3 médio do TFDS se adapte ao exercício durante o desenvolvimento esquelético, perdendo essa capacidade após essa fase. Uma pesquisa recente

investigou a meia-vida de diferentes proteínas da matriz tendínea e confirmou que a meia-vida do colágeno, que é a principal proteína estrutural do tendão, é de décadas, enquanto a das proteínas não colágenas é de meses. Após a maturidade esquelética, o efeito sinérgico da idade e do exercício causa um acúmulo inevitável de microlesões (degeneração), que não podem ser adequadamente reparadas e predispõem à lesão clínica. Os sinais de degeneração subclínica são mínimos e as alterações importantes ocorrem em nível molecular, sem desencadeamento de processo inflamatório ou reparativo (“inflamação molecular”). Corroborando essa hipótese, outros estudos demonstraram a ocorrência de atividade genética na proteína da matriz na região metacarpiana de tendões de bovinos em fase de crescimento, mas não em adultos. Além disso, vários estudos epidemiológicos demonstraram uma íntima associação entre a incidência de lesões tendíneas e a idade, tanto em atletas humanos como em atletas equinos.

Uma das possíveis explicações para essa perda aparente de adaptabilidade é a de que ela seja voltada exclusivamente para as propriedades de mola. A adição ou remoção de matriz não faria sentido, uma vez que reduziria a eficiência da mola (por torná-la mais rígida ou mais elástica). No contexto “normal” do equino enquanto animal de pastejo, o acúmulo de microlesões decorrentes da idade e do exercício não seria suficiente para causar tendinite clínica. Entretanto, o uso do equino em treinamentos de corrida e outras atividades atléticas competitivas acelera esse processo, podendo enfraquecer o tendão a ponto de provocar a tendinite clínica quando a aplicação normal (ou anormal) de carga ultrapassa a capacidade de resistência do tendão degenerado.

Mecanismos degenerativos relacionados à idade

Em nossos estudos, observamos altos níveis de fatores de crescimento, principalmente TGF- β , em tendões equinos jovens, com declínio após a maturidade esquelética. Observamos também que células colhidas de TFDSs velhos (mas, curiosamente, não do tendão extensor digital comum) apresentam redução de aproximadamente 50% da síntese *in vitro* em resposta à aplicação de fatores de crescimento exógenos e de carga mecânica, quando comparadas com tenócitos de TFDSs jovens. Além disso, ocorre uma redução das junções comunicantes (“*gap junctions*”) no TFDS adulto. Portanto, a resposta adaptativa do tendão adulto parece decorrer de uma combinação de ausência ou baixa disponibilidade de fatores de crescimento, redução da comunicação celular e declínio da capacidade de síntese.

Os mecanismos que desencadeiam a degeneração não são bem conhecidos, podendo envolver a injúria de reperfusão e os efeitos da aplicação cíclica de carga, que pode afetar diretamente as células residentes, induzindo a liberação de citocinas ou hipertermia. Tanto a liberação de citocinas como a hipertermia podem modular a liberação de enzimas proteolíticas pelas células residentes, levando à lesão da matriz. O esclarecimento dos mecanismos causadores da degeneração em nível molecular pode vir a permitir o desenvolvimento de estratégias preventivas ou que permitam reduzir a velocidade da degeneração.

Início da doença clínica

Fatores capazes de aumentar a carga máxima aplicada sobre o TFDS, como o peso do cavaleiro, o tipo de superfície e a velocidade do cavalo, aumentam tanto a velocidade de degeneração quanto o risco de tendinite clínica. A lesão pode envolver desde o deslizamento irreversível das fibrilas até a ruptura completa do tendão, passando pela ruptura isolada de fibras e pela ruptura do fascículo. Em casos de ruptura completa, apenas o paratendão costuma ficar intacto, servindo de arcabouço para o reparo, que requer um implante artificial. A falha do tendão desencadeia uma resposta reparativa que resulta na formação de tecido cicatricial, que difere do tendão “normal” em termos de composição, organização e função. No TFDS, a formação de tecido cicatricial é invariavelmente excessiva, resultando em um tendão mais rígido após a conclusão do processo de cicatrização e predispondo a estrutura a novas lesões, por aumentar a tensão nas áreas adjacentes (“zonas de transição”).

Estratégias preventivas

A prevenção das lesões tendíneas se reveste de grande importância, uma vez que a eficiência dos tratamentos deixa a desejar. Com base nos mecanismos de crescimento e degeneração tendínea, podemos concentrar as estratégias preventivas em quatro áreas:

Redução da degeneração após a maturidade esquelética

Estamos investigando os mecanismos idade-dependentes que causam degeneração de tecidos moles e é possível que o seu esclarecimento venha a permitir o desenvolvimento de opções terapêuticas futuras, capazes de influenciar o processo de envelhecimento. Atualmente, a estratégia mais simples é a aplicação de frio após o exercício, embora faltem dados para embasar a eficiência dessa técnica. No momento, o único aconselhamento a ser feito é evitar protocolos de treinamento voltados

apenas para o tendão no equino adulto, uma vez que isso irá apenas aumentar a velocidade de degeneração, que deve ser considerada uma consequência inevitável da atividade atlética. É possível que algumas formas de exercício induzam mais degeneração do que outras, mas no momento podemos apenas supor que os exercícios que envolvem grandes aplicações de carga (em altas velocidades, por exemplo) sejam os mais nocivos.

Redução dos fatores de risco para a tendinite

A tendinite clínica é causada pela aplicação repentina de forças que ultrapassam a força do tendão (degenerado). Isso pode ocorrer a qualquer momento, inclusive no pasto, mas obviamente é mais comum quando o cavalo trabalha próximo do limite máximo do tendão. Essa situação é verificada durante o exercício em velocidade máxima, fazendo do melhor cavalo o mais predisposto à lesão tendínea. A superfície de apoio (que afeta a velocidade do cavalo), a fadiga (após corridas longas ou em animais mal condicionados, por exemplo), o salto, o ferrageamento e o peso são exemplos de fatores que podem aumentar a carga máxima aplicada sobre o tendão e, conseqüentemente, o risco de lesão. Alguns desses fatores são passíveis de correção, embora outros sejam inerentes à corrida e não possam ser facilmente alterados.

Diagnóstico precoce

Aqui, não se trata exatamente de uma estratégia de prevenção, uma vez que algum grau de lesão tendínea já terá ocorrido. Entretanto, se a lesão (ou degeneração) for detectada precocemente, podemos tentar impedir a progressão para um quadro mais grave. A inspeção cuidadosa é obviamente fundamental, embora seja pouco sensível.

A ultrassonografia é a principal técnica de imagem empregada em tendões, tendo contribuído muito para o nosso conhecimento e capacidade de tratamento. A tecnologia ultrassonográfica continua progredindo, com o advento de novos aparelhos, dotados de melhor resolução. Entretanto, a técnica ainda é pouco sensível na previsão de lesões e na determinação do momento ideal de retorno à atividade plena nos estágios crônicos. De fato, um trabalho recente desenvolvido por nossa equipe mostrou que, em um grupo grande de cavalos do *National Hunt* (n=150), examinados ultrassonograficamente a cada três meses, durante duas estações, não foram detectadas alterações de ecogenicidade ou área de secção transversal antes da ocorrência de lesões, negando o valor da ultrassonografia como ferramenta de avaliação, exceto na detecção de lesões prévias, associadas ao maior risco de recorrência.

Por esse motivo, estamos trabalhando no desenvolvimento de um marcador sanguíneo de lesão tendínea em

equinos. A lesão causa a liberação de fragmentos proteicos tendíneos, cujo reconhecimento através de ensaios sanguíneos pode vir a ser um teste prático (coleta de uma amostra sanguínea), capaz de fornecer informações úteis em termos de diagnóstico, tratamento e prognóstico.

Maximização da qualidade do tendão antes da maturidade esquelética

A força do tendão flexor digital superficial varia muito entre diferentes animais e, uma vez que parte dessa variação pode ser de fundo genético, a melhora dessa característica poderia reduzir a incidência de lesões tendíneas. Entretanto, embora o conceito seja simples, sua aplicação é bastante difícil.

Os tecidos esqueléticos se adaptam muito melhor à aplicação de carga durante a fase de crescimento, enquanto são imaturos. Isso se verifica nos ossos e músculos e acredita-se que seja verdade também para o tendão. Assim, o emprego de programas de exercício cuidadosamente elaborados, durante a fase de crescimento (o a 2 anos de idade), poderia melhorar a “qualidade” do tendão, minimizando os efeitos degenerativos induzidos pelo treinamento e pelas corridas após a maturidade esquelética (aproximadamente aos 2 anos, no cavalo). Tais programas de exercício devem ser aplicados dentro da “janela de oportunidade”, ou seja, no momento e na intensidade certos. Tendões em crescimento são também mais susceptíveis a lesões e programas de “condicionamento” devem ser capazes de induzir adaptação compatível com a atividade atlética futura, sem causar lesão. Estas perguntas permanecem sem respostas, embora três estudos tenham investigado o efeito do exercício sobre o tendão imaturo (em crescimento). O primeiro, realizado na Universidade de Utrecht, na Holanda, envolveu três protocolos diferentes de exercício (repouso em baia, repouso em baia com *sprint* forçado e exercício a pasto) aplicados em potros de raças leves (“*warmbloods*”), entre as 6 semanas e os 5 meses de idade; o segundo, realizado pela *Japan Racing Association*, empregou quantidades crescentes de exercício em esteira em potros PSI, entre 6 semanas e 15 meses de idade; e o terceiro (projeto *Global Equine Research Alliance [GERA]*), ainda em andamento, envolveu potros exercitados em pista, com ingresso subsequente dos potros “condicionados” no treinamento e nas corridas. Nos dois primeiros estudos, os potros exercitados foram comparados com potros que receberam apenas exercício ao pasto.

No primeiro estudo, os potros mantidos no pasto apresentaram tendões significativamente mais fortes aos 5 meses de idade do que os potros dos demais grupos, em grande parte devido ao desenvolvimento de área de secção transversal maior. O segundo estudo documentou

aumento significativo da velocidade de aumento da área de secção transversal do tendão flexor digital superficial, após exercício em esteira diário de curta duração (5 *sprints* de 15 segundos) combinado com exercício no pasto. No que se refere à análise do tecido tendíneo em si, no primeiro estudo o exercício a pasto resultou no aparecimento mais rápido da população de fibrilas colágenas maduras, enquanto o repouso em baia e o repouso em baia combinado com exercício forçado atrasaram o estabelecimento desse fenótipo “adulto”. Nos outros dois experimentos, o exercício adicional (além do exercício realizado a pasto) teve pouco efeito sobre o tamanho das fibrilas colágenas e sobre muitos dos componentes principais do tendão. Os resultados indicam que o exercício a pasto é ideal para o desenvolvimento tendíneo, ou que o nível de exercício adicional imposto aos potros não foi suficiente.

As atividades lúdicas que os potros realizam no pasto certamente parecem ideais para a aplicação controlada de carga de alta intensidade sobre os tendões flexores, que acreditamos ser a mais adequada para a adaptação tendínea. Pode ser que existam “janelas de oportunidade” de tempo e intensidade, além das quais as propriedades do tendão não possam ser melhoradas.

Até aqui, falamos apenas dos tendões. E os demais tecidos esqueléticos, como respondem a esses protocolos de exercício? Não sabemos, embora os diferentes tecidos esqueléticos atinjam a maturidade em momentos diferentes, indicando a existência de “janelas de oportunidade” tecido-específicas. Acreditamos que os tendões, os ligamentos e a cartilagem sejam mais responsivos no primeiro ano de vida, enquanto o osso é mais responsivo durante

a puberdade. O treinamento de animais adultos deve ser voltado para os tecidos dotados de resposta contínua, como o tecido muscular e o tecido ósseo, e para os órgãos essenciais para a forma física geral, como os dos sistemas cardiovascular e respiratório.

Agradecimentos

The Royal Veterinary College – Professor Allen Goodship, Dr. Janet Patterson-Kane, Dr. Helen Birch, Dr. Eddy Cauvin, Dr. Shelley Goodman, Dr. Jay Dudhia

The University of Utrecht – Dr. Worakij Cherdchutham, Professor Ab Barneveld and Dr. Rene van Weeren

The Japan Racing Association (JRA) – Dr. Yoshinori Kasashima

The Global Equine Research Alliance (GERA) – Professor Elwyn Firth and Dr. Chris Rogers, Massey University, New Zealand

Professor Wayne McIlwraith and Dr. Chris Kawcak, Colorado State University, USA

Professor Ab Barneveld and Dr. Rene van Weeren, Utrecht University

Professors Allen Goodship and Roger Smith, The Royal Veterinary College, UK

FUNDING SOURCES: HBLB, Horse Trust, Japan Racing Association, BBSRC, Wellcome Trust

Referências

1. Smith, R. K. W. Pathophysiology of equine tendonitis. In: Ross, M.; Dyson, S. J. (Org.) *Lameness in Horses*. 2nd edition, 2010. Chapter 68. p. 694-706.

Transferência de embriões em equinos: recuperação do embrião¹

Introdução

A transferência de embriões é uma técnica reprodutiva comum na medicina veterinária e tem a vantagem de permitir que éguas de alto valor produzam mais de um potro por ano, que éguas mais velhas doem embriões a receptoras mais novas, que éguas subférteis doem embriões a éguas em melhor condição reprodutiva e que éguas em atleta s doem embriões sem interromper o treinamento. O primeiro potro obtido por transferência de embriões nasceu em 1974. Durante os 36 anos subsequentes, vimos o desenvolvimento de equipamentos e técnicas voltados para o maior sucesso da coleta de embriões. O objetivo deste artigo é revisar as técnicas de recuperação embrionária e fornecer dados sobre o seu sucesso em programas de transferência de embriões.

Materiais e métodos

A recuperação do embrião costuma ser tentada 7 ou 8 dias após a ovulação (MCCUE et al., 2001; SQUIRES et al., 2003). A coleta de embriões menores (< 300 µm, por exemplo) para criopreservação requer lavagem no dia 6,5 ou no início do dia

7 após a ovulação. Emprega-se um cateter de silicone de 8,0 mm de diâmetro com balonete inflável para facilitar a lavagem transcervical e um filtro coletor para embriões de 75 µm acoplado ao equipo de saída, podendo-se também regular manualmente o equipo na altura do filtro. Um conjunto estéril de equipo em Y, com sistema de regulação do fluxo de entrada e saída, é empregado para conectar o cateter ao frasco de fluido e ao filtro coletor.

A coleta do embrião pode ser feita usando-se um meio de lavagem comercial “completo” contendo um agente de tamponamento, antibiótico e surfactante, ou empregando-se simplesmente solução de Ringer com lactato acrescida ou não de soro de bezerro ou albumina sérica bovina purificada (BSA) como agente surfactante, para prevenir a aderência do embrião ao equipo, ao filtro ou à placa.

O útero da égua doadora é lavado de três a quatro vezes consecutivas com 1 litro de fluido preaquecido (30-35 °C) ou à temperatura ambiente por vez. A quantidade de fluido empregada em cada lavagem depende do tamanho do útero e/ou da paridade da égua e o objetivo é provocar expansão suficiente do lúmen uterino para que o fluido chegue a todas as suas partes, incluindo a área entre ou sob as pregas endometriais. O meio de lavagem reflui através do cateter por gravidade, passando pelo filtro coletor, podendo-se massagear o útero por via

¹ Palestra apresentada na XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abraceq), realizada em 11 e 12 de junho de 2011 no Royal Palm Plaza Resort, em Campinas (SP).

retal durante o procedimento de infusão e recuperação do meio. A recuperação do fluido de lavagem pode ser monitorada empregando-se um frasco graduado para mensuração do efluente e/ou o exame ultrassonográfico do útero ao final do procedimento.

A busca do embrião pode ser iniciada após cada lavagem sucessiva ou após a recuperação do volume final de meio, despejando-se o conteúdo do filtro em uma placa e procedendo-se com o seu exame. Na ausência de embriões, pode-se realizar nova infusão de meio no útero e medicar a égua com 20 unidades de ocitocina, pela via intravenosa, a fim de estimular as contrações uterinas. O meio é mantido no útero da égua por aproximadamente 3 minutos antes de permitir seu refluxo por gravidade, estimulado pela massagem retal (HINRICHS et al., 1990; MCCUE et al., 2003). No final do procedimento de lavagem do embrião, a égua doadora recebe prostaglandinas para desencadear a luteólise.

A taxa de recuperação de embriões é influenciada por muitos fatores, como a idade e a fertilidade da égua doadora, a qualidade do sêmen do garanhão, o dia da recuperação, o número de ovulações e a experiência do clínico (MCCUE et al., 2001; SQUIRES et al., 2003), e se correlaciona com a idade e a condição reprodutiva da égua doadora. Observa-se um percentual maior de recuperação de embriões em éguas com menos de 10 anos de idade do que em éguas com mais de 15 anos de idade. A taxa de recuperação de embriões é aproximadamente 5 a 10% inferior à taxa esperada de prenhez por ciclo.

Foi realizada uma análise retrospectiva do sucesso da recuperação de embriões no programa da Universidade do Colorado. Os embriões foram avaliados quanto à qualidade, tamanho e estágio de desenvolvimento, conforme descrito anteriormente. As comparações das taxas de recuperação e do tamanho dos embriões entre os grupos foi feita através do programa SAS. Todos os valores foram apresentados como média \pm e.p.m.

Resultados

Um total de 492 procedimentos de recuperação realizados em éguas de clientes na Universidade do Colorado entre 2004 e 2008 foi revisado, incluindo-se apenas os dados dos casos em que o manejo da égua doadora foi realizado no local. Um total de 257 embriões foi coletado e, em um pequeno número de casos, não havia registro do escore de qualidade do embrião ou do seu estágio de desenvolvimento. A idade exata do embrião em relação ao dia da coleta não era conhecida nos casos de ovulações duplas assíncronas com coleta de único embrião.

De uma forma geral, o número médio de ovulações por ciclo e o número de embriões recuperados por lavagem foi de $1,18 \pm 0,02$ e $0,52 \pm 0,03$, respectivamente. As taxas de recuperação por lavagem e por ovulação ficaram em 48,1% e 45,2%, respectivamente. A maioria dos embriões (97,6%) recuperados apresentou qualidade excelente (Grau 1) ou boa (Grau 2) (**Tabela 1**). O tamanho médio (diâmetro externo) do embrião praticamente dobrou em cada dia consecutivo de coleta (**Tabela 2**). Os percentuais

GRAU	COMENTÁRIO	Nº DE EMBRIÕES	PERCENTUAL (%)
1	Excelente	198	78,9 %
2	Bom	47	18,7 %
3	Ruim	6	2,4 %
4	Degenerado ou Morto	0	0 %

TABELA 1 – Qualidade (grau) de 251 embriões coletados de éguas doadoras

DIA DA COLETA	Nº DE EMBRIÕES	MÉDIA ± D.P. (µM)	FAIXA (µM)
6	20	191,8 ± 13,2	150-325
7	183	354,0 ± 13,9	150-900
8	35	623,9 ± 72,9	150-2500

TABELA 2 – Diâmetro (µm) de 238 embriões em relação ao dia da coleta

ESTÁGIO	Nº DE EMBRIÕES	PERCENTUAL (%)	MÉDIA ± D.P. (µM)	FAIXA (µM)
Mórula	31	12,2	156,7 ± 3,0	125-200
Blastocisto inicial	66	25,9	188,5 ± 3,9	150-225
Blastocisto	44	17,3	295,9 ± 6,3	200-400
Blastocisto Expandido	115	45,1	598,0 ± 22,5	250-2500

TABELA 3 – Estágio de Desenvolvimento embrionário de 256 embriões coletados de éguas doadoras

de embriões em vários estágios de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) estão dispostos na **Tabela 3**.

A idade da égua doadora influenciou a taxa de recuperação, obtendo-se a recuperação de um ou mais embriões em 144 de 252 lavagens (57,1%) realizadas em éguas com idade ≤ a 15 anos e em 93 de 236 lavagens (39,4%) realizadas em éguas com mais de 15 anos de idade. Os embriões recuperados de éguas de idade ≤ a 5 anos tenderam ($p < 0,1$) a ser maiores em um determinado dia de coleta do que os embriões coletados de éguas de mais de 5 anos de idade. Não houve diferenças de tamanho entre os embriões coletados de éguas com idade ≤ a 15 anos e de éguas com mais de 15 anos de idade.

Éguas inseminadas com sêmen fresco ou refrigerado produziram um ou mais embriões em 51,9% (27/52) e 51,6% (182/353) dos ciclos, respectivamente. Em contrapartida, éguas inseminadas com sêmen congelado geraram um ou mais embriões em 33,3% (26/78) dos ciclos. O diâmetro dos embriões recuperados no dia 7 ($n = 144$), de éguas inseminadas com sêmen refrigerado ($401,9 \pm 19,6 \mu\text{m}$), foi maior ($p < 0,05$) do que o dos embriões recuperados no mesmo dia, de éguas ($n = 11$) inseminadas com sêmen congelado ($258,2 \pm 33,3 \mu\text{m}$) (**Figura 1**). Os embriões ($n = 24$) coletados no dia 8, de éguas inseminadas com sêmen refrigerado, tenderam

($p = 0,053$) a ser maiores ($716,9 \pm 104,9 \mu\text{m}$) do que os embriões ($n = 10$) coletados no mesmo dia, de éguas inseminadas com sêmen congelado ($383,5 \pm 54,9 \mu\text{m}$).

Um ou mais embriões foram recuperados em 43 de 72 ciclos (59,7%) com ovulações duplas espontâneas e em 190 de 406 ciclos (46,8%) com ovulações únicas ($p < 0,05$). A taxa de recuperação de embriões por ovulação foi de 46,8% nos ciclos com ovulações únicas e de 41,1% nos ciclos com ovulações duplas. O número de embriões recuperados de 34 éguas com ovulações duplas unilaterais ($0,9 \pm 0,8$ embriões por lavagem) não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do número de embriões recuperados de 34 éguas com ovulações duplas bilaterais ($0,8 \pm 0,8$ embriões por lavagem).

Éguas que apresentaram quantidades mínimas ou ausência de fluido no útero após a cobertura produziram um embrião em 158 de 307 lavagens (51,5%), enquanto éguas que apresentaram acúmulo discreto a moderado de fluido após a cobertura geraram um embrião em 78 de 176 ciclos (44,3%) ($p = 0,1016$). O tratamento das éguas nesta última categoria foi feito com uma combinação de lavagem uterina e agentes ecbólicos (ocitocina ou prostaglandinas).

A qualidade, ou as características, do meio recuperado mostrou relação com o sucesso da recuperação de embriões. Éguas com quantidades mínimas de debris no efluente uterino produziram um embrião em 235 de 462

lavagens (50,9%), contra apenas 2 embriões recuperados em 21 lavagens (9,5%) com saída de fluido turvo ou contendo quantidades anormais de debris ($p < 0,001$).

Em 31 ocasiões, a égua doadora foi submetida à nova lavagem após a falha na recuperação do embrião, com resultados positivos em 3 destas 31 tentativas (9,7%). Na maioria das lavagens repetidas, notou-se um aumento da turbidez ou da quantidade de debris no meio recuperado.

Em geral, as éguas foram lavadas mais de uma vez por estação e o percentual de tentativas de recuperação com obtenção de um ou mais embriões tendeu ($p = 0,1009$) a ser mais elevado nas éguas lavadas de 1 a 4 vezes por estação (217/439; 49,4 %) do que nas éguas lavadas 5 ou mais vezes (20/53; 37,7 %) (Tabela 4).

A presença de um ovócito não fertilizado (UFO) no meio recuperado foi registrada em 3 de 495 procedimentos de lavagem, com recuperação de um embrião junto com o UFO em 1 deles. É possível que, em alguns casos, a recuperação de um UFO não tenha sido registrada.

Discussão

A maioria dos embriões equinos coletados apresenta qualidade boa a excelente devido ao transporte seletivo de embriões viáveis através do oviduto, que é facilitado pela secreção de prostaglandina E_2 (PGE_2) pelo embrião (WEBER et al., 1991). Embriões de má qualidade, embriões mortos e ovócitos não fertilizados tendem a ficar retidos no oviduto.

A idade e a condição reprodutiva da égua doadora têm influência significativa sobre o sucesso da recuperação de embriões. As taxas de coleta de embriões foram mais altas em éguas de menos de 15 anos de idade, em éguas que não apresentaram acúmulo de fluido no útero após a inseminação e nos ciclos com pequena quantidade ou ausência de debris no lavado uterino. Esperávamos encontrar uma relação entre a idade da égua e o tamanho do embrião, com embriões menores nas éguas mais velhas, mas não houve diferenças significantes no diâmetro

dos embriões coletados no dia 7 ou 8, de éguas de idade superior ou inferior a 15 anos.

O tipo de sêmen utilizado influenciou a taxa de recuperação de embriões e o diâmetro médio dos embriões coletados em um determinado dia. Éguas inseminadas com sêmen congelado apresentaram taxas de recuperação mais baixas e geraram embriões menores em cada dia de coleta do que éguas inseminadas com sêmen fresco ou resfriado. Acredita-se que isso possa ser devido a um atraso na fertilização ou no desenvolvimento embrionário precoce associado ao uso do sêmen congelado.

Em geral, observa-se uma associação entre o aumento da taxa de ovulação e o aumento da taxa de recuperação de embriões (SQUIRES et al., 1987; LOSINNO et al., 2000), o que se comprovou em nossos resultados. Neste estudo, não houve diferenças nas taxas de recuperação de éguas com ovulações duplas unilaterais ou bilaterais,

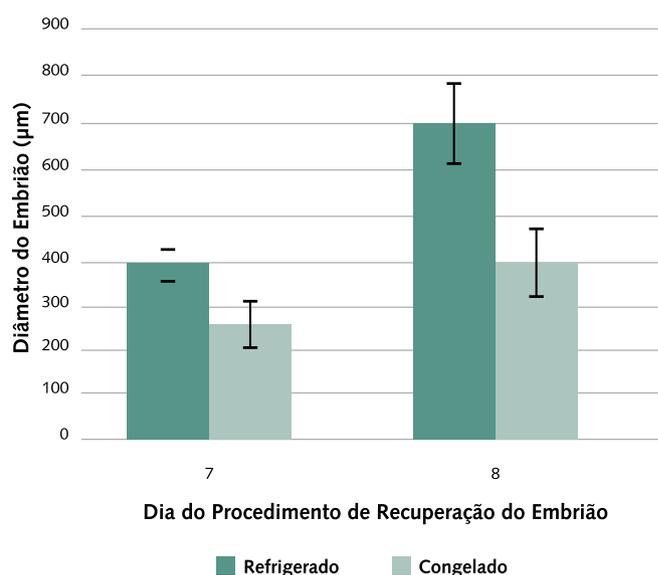


Figura 1 – Diâmetro médio dos embriões coletados no dia 7 ou 8 após a ovulação, de éguas inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado.

Nº DE LAVAGENS POR ANO	Nº TOTAL DE LAVAGENS POSITIVAS	Nº TOTAL DE CICLOS	% DE LAVAGENS POSITIVAS
1	83	174	47,7
2	64	132	48,5
3	47	89	52,8
4	23	44	52,3
5	9	24	37,5
6	4	13	30,8
≥7	7	16	43,8

TABELA 4 – Relação entre o número de tentativas de recuperação de embriões por ano e o percentual de lavagens com recuperação de um ou mais embriões

discordando de um estudo grande realizado na Argentina, em que as taxas de recuperação de embriões foram maiores nas éguas com ovulações duplas bilaterais do que nas com ovulações duplas unilaterais (RIERA, 2006).

A possibilidade de existência de um embrião no útero após uma tentativa negativa de lavagem deve ser considerada. Betteridge e colaboradores (BETTERIDGE et al., 1985) relataram a ocorrência de prenhez em 4 éguas das quais nenhum embrião havia sido recuperado em lavados uterinos realizados entre os dias 6,5 e 9,5 após a ovulação. McKinnon e colaboradores (MCKINNON et al., 1988) também diagnosticaram prenhez positiva em 9 de 27 éguas, após a falha na tentativa de recuperação de embriões 6,5 dias após a ovulação. Por este motivo, recomenda-se a administração de prostaglandinas após a conclusão do procedimento de recuperação do embrião, a fim de provocar a regressão do corpo lúteo, permitindo que a égua retorne ao cio e garantindo que ela não mantenha a prenhez caso o embrião não tenha sido recuperado.

Em nossa clínica, quando o embrião não é recuperado após uma série inicial de lavagens uterinas, uma lavagem adicional é imediatamente realizada, e a instituição dessa “lavagem extra” aumentou muito nossa taxa geral de recuperação de embriões (MCCUE et al., 2003). Não sabemos se a recuperação do embrião durante a “lavagem extra” se deve à ocitocina administrada, aos 3 minutos de dilatação uterina com meio de lavagem ou simplesmente à repetição da infusão e recuperação de fluido. Em nosso programa, não costumamos repetir a lavagem no dia seguinte a uma tentativa negativa de recuperação, embora tenhamos realizado tal procedimento inúmeras vezes ao longo dos anos, em um esforço final desesperado de recuperar o embrião. Curiosamente, obtivemos resultados positivos em 9,7% dessas tentativas e observamos que o meio recuperado costuma ser levemente turvo ou conter debris celulares.

O percentual de lavagens positivas foi maior durante as 4 primeiras lavagens da estação reprodutiva do que nas tentativas subsequentes, o que pode ser devido ao fato de algumas éguas no nosso programa serem consideradas subférteis, requerendo mais de um ciclo para que um embrião possa ser recuperado. Entretanto, isso também pode refletir alterações da condição do útero após múltiplos ciclos de inseminação e lavagem, conforme dados de um estudo prévio, em que éguas submetidas a ciclos repetidos de inseminação e coleta de embriões apresentam alterações inflamatórias uterinas crônicas (CARNEVALE et al., 2005).

Ovócitos não fertilizados (UFOs) costumam ficar retidos no oviduto, próximo à junção ampulo-ístmica (WEBER et al., 1991; BETTERIDGE, 1989; STEFFENHAGEN, 1972). Em geral, a recuperação de um UFO só ocorre quando esse é transportado através da junção

útero-tubárica junto com um embrião viável. Nos casos em que um UFO é recuperado isoladamente, recomenda-se a realização de uma lavagem adicional, na esperança de recuperar o embrião (MCCUE et al., 2009).

Em síntese, as taxas de coleta de embriões foram mais altas em éguas mais jovens e em éguas que não acumulam fluido no útero após a inseminação. O aumento da taxa de ovulação foi associado a um aumento da recuperação de embriões, sem influência do local de ocorrência das ovulações múltiplas (unilaterais ou bilaterais). Lavagens adicionais realizadas imediatamente após uma tentativa negativa de recuperação, ou no dia seguinte, levaram à recuperação de embriões.

Referências

- McCue, P. M.; Squires, E. L.; Bruemmer, J. E. et al. Equine embryo transfer: techniques, trends and anecdotes. In: **Proceedings** Annual Conference of the Society for Theriogenology, 2001. p. 229-235.
- Squires, E. L.; Carnevale, E. M.; McCue, P. M. et al. Embryo technologies in the horse. In: **Theriogenology**, 2003. 59 . p. 151-170.
- Hinrichs, K. A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. In: **Theriogenology**, 1990. 33 . p. 937-942.
- McCue, P. M.; Niswender, K. D.; Macon, K. A. Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. In: **J Equine Vet Sci**, 2003. 23 . p. 1-2.
- McCue, P. M.; DeLuca, C. A.; Ferris, R. A. et al. How to evaluate equine embryos. In: **Proceedings**, American Association of Equine Practitioners, 2009. 55 . p. 252-256.
- Weber, J. A.; Freeman, D. A.; Vanderwall, D. K. et al. Prostaglandin E₂ secretion by oviductal transport-stage equine embryos. In: **Biol Reprod**, 1991. 45 . p. 540-543.
- Squires, E. L.; McKinnon, A. O.; Carnevale, E. M. et al. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **J Reprod Fertil**, 1987. Suppl 35 . p. 399-403.
- Losinno, L.; Aguilar, J. J.; Lisa, H. Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: **Proceedings** 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, 2000. p. 81-83.
- Riera, F. L.; Roldán, J. E.; Hinrichs, K. Patterns of embryo recovery in mares with unilateral and bilateral double ovulations. In: **Animal Reproduction Science**, 2006. 94 . p. 398-399.
- Betteridge, K. J.; Renard, A.; Goff, A. K. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. In: **Equine Vet J**, 1985. Suppl 3 . p. 25-33.
- McKinnon, A. O.; Squires, E. L.; Voss, J. L. et al. Equine embryo transfer. In: **Comp Contin Ed Pract Vet**, 1988. 10 . p. 343-355.
- McCue, P. M.; Niswender, K. D.; Macon, K. A. Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. In: **J Equine Vet Sci**, 2003. 23 . p. 1-2.
- Carnevale, E. M.; Beisner, A. E.; McCue, P. M. et al. Uterine changes associated with repeated inseminations and embryo collections in mares. In: **Proceedings** American Association of Equine Practitioners, 2005. 51 . p. 202-203.
- Betteridge, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. In: **Equine Vet J**, 1989. Suppl 8. p. 92-100.
- Steffenhagen, W. P.; Pineda, M. H.; Ginther, O. J. Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. In: **Am J Vet Res**, 1972. 33. p. 2391-2398.

Normas para publicação

- As colaborações enviadas à **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia** na forma de artigos, pesquisas, nota prévia, comentários, atualizações bibliográficas, relatos de casos, notícias e informações de interesse para a classe médica veterinária e zootécnica devem ser elaboradas utilizando softwares padrão IBM/PC, ou seja, textos em Word for DOS ou Winword até versão 2007; gráficos em Winword, Power Point ou Excel até versão 2007, ou PageMaker 7; e ilustrações em CorelDraw até versão X3 (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou Photoshop até versão CS4.
- **Revisão:** Os artigos de revisão têm estrutura livre de acordo com os objetivos do(s) autor(es) e da Revista. O artigo de revisão deve apresentar avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto. De preferência, a estrutura deve contemplar o resumo, a introdução, os objetivos, as fontes consultadas, os critérios adotados, a síntese dos dados, conclusões e comentários.
- **Artigo técnico:** Contribuição destinada a divulgar o estado da arte e da ciência em assuntos técnico-científicos que envolvem a medicina veterinária e zootecnia. Trata-se de abordagem contemplando informações com o objetivo de educação continuada, uma vez que contribuições científicas com resultados de pesquisas originais devem ser publicadas em revistas especializadas com corpo e perfil editorial específico. A estrutura é livre, devendo conter o resumo, a introdução, os objetivos do artigo e referências.
- **Relato de caso:** Serão aceitos para publicação os relatos que atenderem os objetivos da educação continuada nas áreas da medicina veterinária e da zootecnia. Estrutura: introdução, descrição do caso, discussão e conclusões, referências.
- **Ensaio:** Estudos teóricos de determinados temas apresentados sob enfoque próprio do(s) autor(es).
- Com a finalidade de tornar mais ágil o processo de diagramação da revista, solicitamos aos colaboradores que digitem seus trabalhos em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas. O tipo da fonte pode ser Times New Roman ou similar, no tamanho 12.
- Os gráficos, figuras e ilustrações devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre seis e nove laudas (aproximadamente nove páginas em fonte TNR 12, com espaço duplo e margens 2,5 cm). No caso dos artigos de revisão, em casos excepcionais, o tamanho total do trabalho poderá ser superior a nove páginas.
- Do trabalho, devem constar título em português e em inglês, nome completo do autor e co-autores, nome completo das instituições às quais pertencem, summary, resumo e palavras-chave.
- As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações, à NBR 10520, sistema autor-data.
- Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo-se a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi). Além de constarem no texto, as figuras e ilustrações devem ser encaminhadas em arquivos separados, em seu tamanho original, seguindo a resolução solicitada.
- O primeiro autor deverá fornecer seu endereço completo (rua, no, CEP, cidade, Estado, país, telefone, fax e e-mail), o qual será o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.
- Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente on-line para comunicacao@crmvsp.org.br.
- Recebido o trabalho pela Redação, será enviada declaração de recebimento ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis. Caso isso não ocorra, entre em contato com a Assessoria de Comunicação do CRMV-SP pelo telefone: (11) 5908 4772.
- Arquivos que excederem a 1 MB deverão ser enviados zipados (WinZip ou WinRAR).
- Será necessário que os colaboradores mantenham seus antivírus sempre atualizados.
- As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite via e-mail.
- As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.
- Não serão remetidos trabalhos via fax.
- As matérias enviadas para publicação não serão retribuídas financeiramente aos autores, os quais continuarão de posse dos direitos autorais referentes às mesmas. Parte ou resumo das matérias publicadas nesta revista, enviadas a outros periódicos, deverão assinalar obrigatoriamente a fonte original.



Dúvidas

comunicacao@crmvsp.gov.br

Uma ferramenta para auxiliar o profissional

Base Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia - Vet Index

Indexa artigos publicados em
periódicos científicos nacionais

Base Nacional de Teses (em desenvolvimento)

Catálogo de dissertações e
teses defendidas em todas as
instituições de ensino brasileiras

LIS - Localizador de Informação em Medicina Veterinária e Zootecnia

Catálogo de fontes de
informação em saúde disponível
na internet

Agenda de Eventos e Cursos

Catálogo nacional on-line
contendo os eventos e cursos
nacionais e internacionais em
Medicina Veterinária e Zootecnia

Revistas Eletrônicas

Revistas científicas eletrônicas
de acesso gratuito (open access)
das áreas de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Busca Integrada

Busca simultaneamente artigos
indexados em diversas bases
de dados referenciais e com
texto completo



Atendimento
>> ON-LINE

Das 8h às 17h
De 2ª a 6ª feira



facebook.com/bvsvet



twitter.com/bvsvet



bvsvet.blogspot.com



br.linkedin.com/in/bvsvet



www.bvs-vet.org.br

Biblioteca Virtual em Medicina Veterinária e Zootecnia - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
CEP 05508-270 - São Paulo (SP) - Brasil
Tel: +55 11 3091-7921 - e-mail: bvsvet@usp.br

Parceria de:

