

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ARIANE PAULA ROVANI SCOLARI

**SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM
RUMINANTES DOMÉSTICOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.**

(Seroprevalence of Bluetongue virus in domestic ruminants of Paraná State, Brazil.)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2011

ARIANE PAULA ROVANI SCOLARI

**SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM
RUMINANTES DOMÉSTICOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.**

(Seroprevalence of Bluetongue virus in domestic ruminants of Paraná State, Brazil.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração: Patologia Animal e Comparada, Cirurgia e Clínica, do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff.

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2011**

Dedico esta obra aos meus pais,

Paulo e Delcir Scolari.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção de minha família, pela proteção de todos os meus dias e por proporcionar mais esta conquista em minha vida. Ainda, por me proporcionar nos últimos dias desta caminhada, um presente iluminado para toda minha vida – meu querido Pedro.

Aos meus pais, pela demonstração do caminho correto. Pelo máximo apoio em minhas dificuldades, nos momentos de desânimo. Vocês acreditaram em mim mais uma vez, esta obra é para vocês. Obrigada por existirem em minha vida. Sinto amor incondicional.

Ao meu querido irmão Paulinho! Sua descontração é essencial para as nossas vidas! Obrigada por me fazer sorrir.

Ao meu companheiro em todos os momentos, Jakson, muito obrigada! Você é essencial em nossas vidas!

Ao professor Dr. Daniel Ollhoff, meu orientador. Cada palavra de apoio e credibilidade foi fundamental para a realização desta obra, conheci um verdadeiro Mestre. Obrigada pela confiança depositada em mim.

Ao amigo Paulo Prichla, por me acompanhar durante quase 3.500 km nas rodovias do Paraná, em nossas esperadas férias de janeiro de 2010, para colheita do material a ser utilizado em nosso trabalho.

As queridas amigas Aline e Mariana, por cada minuto de companheirismo e ajuda nesta conquista, tanto no campo de trabalho como no meu mais íntimo sentimento!

A Zandreli Elis Catelli, obrigada pela sua paciente e insubstituível ajuda.

A Msc. Rosária Richartz, virologista do Centro Diagnóstico “Marcos Enrietti”. Agradeço pelos seus ensinamentos e pela paciência em finalizar o nosso trabalho.

Aos meus amigos do Hospital Veterinário para Animais de Fazenda da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Ricardo Rodrigues Pagnoncelli e Josiane Mendes. Pessoas especiais que jamais esquecerei, vocês fazem parte do meu crescimento pessoal, obrigada por acreditarem em mim! Saudades.

Aos meus colegas das Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu, muito obrigada por alegrarem minhas tardes de trabalho!

Não deixaria de agradecer meus queridos alunos! A turma de cima, a turma de baixo e a galera da técnica cirúrgica!

Finalizo agradecendo a cada produtor que nem sequer pode imaginar a sua contribuição para a ciência e para a evolução do conhecimento científico. Agradeço infinitamente aos animais que fizeram parte da minha pesquisa.

Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer - Prêmio Nobel da Paz, 1952.

RESUMO

A Língua Azul (LA) é uma doença viral de ruminantes, não contagiosa, transmitida por artrópodes e economicamente importante, com distribuição mundial. No Brasil, a LA foi primeiramente descrita em bovinos e ovinos no Estado de São Paulo. Desde então, a circulação viral tem sido demonstrada nos Estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Mato Grosso do Sul e, no Paraná, o primeiro caso clínico foi identificado em 2001 em caprinos. Não existem vacinas disponíveis contra a LA no mercado brasileiro e também nenhum programa nacional de prevenção para a doença. O estudo teve como objetivo detectar a presença de anticorpos para o vírus da Língua Azul em ruminantes domésticos (ovinos, caprinos e bovinos) no Estado do Paraná. Foram analisadas 276 amostras de soro sanguíneo de animais provenientes de 24 rebanhos de 18 municípios do Estado do Paraná. Encontraram-se 47,46% das amostras soropositivas (40,95% dos ovinos; 77,55% dos bovinos; e 41,02% dos caprinos). Todas as amostras (n=53) obtidas nos municípios de Arapongas, Bituruna e Ponta Grossa foram soronegativas para o vírus da Língua Azul. Todas as amostras (n=37) obtidas em Cambé, Florestópolis e Guarapuava resultaram em soropositivos para o vírus. Nos demais 12 municípios abordados houve uma variação da soropositividade entre um mínimo de 8,3% e um máximo de 100%. Como não foram observados casos clínicos nos rebanhos examinados, nem notificados animais sintomatológicos, conclui-se que as infecções são inaparentes. Esses resultados sugerem que o vírus da Língua Azul encontra-se disseminado pelo Estado do Paraná.

Palavras-chave: Vírus da Língua Azul. Bovinos. Ovinos. Caprinos. Sorologia.

ABSTRACT

Bluetongue (BT) is an arthropod-borne, non contagious and economically important viral disease of ruminants with worldwide distribution. In Brazil, BT was first described in cattle and sheep in the State of São Paulo. Since then, viral circulation has been demonstrated in the states of Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Mato Grosso do Sul and in Paraná the first clinical case was identified in 2002 in goats. There are no available vaccines against BT on Brazilian market neither there is a national preventive program for this disease. The study aimed to detect the presence of antibodies to Bluetongue virus in domestic ruminants (sheep, goats and cattle) at Paraná State. We analyzed 276 blood serum samples from 24 herds in 18 counties of Paraná State. 47,46% of the samples were seropositive (40,95% in sheep; 77,55% of the cattle; and e 41,02% of the goats). All the samples (n=53) collected at the counties of Arapongas, Ponta Grossa and Bituruna were seronegative to bluetongue virus. All the samples (n=37) obtained at the counties of Cambé, Florestópolis and Guarapuava were seropositive for the virus. Seropositivity varied at the remaining 12 counties between a minimum of 3,2% and a maximum of 6,5%. As no clinical cases were observed in the flocks examined and no symptomatic animals reported, we conclude that the infections are inapparent. These results suggest that the Bluetongue Virus is widespread through the State of Paraná.

Keywords: Bluetongue Virus. Cattle. Sheep. Goat. Serology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Mapa do Estado do Paraná, destaque em cores os municípios fornecedores de amostras de soro 41

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Contenção de um bovino e captura de insetos sendo realizada através de aspiração..... 57

Figura 2 – Aparelho do tipo aspirador utilizado para captura de insetos hematófagos em propriedades do Estado do Paraná 58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Porcentagem de animais soropositivos para o Vírus da Língua Azul, em diferentes espécies ruminantes ordenados cronologicamente e por Estados brasileiros 23

CAPÍTULO 2

Quadro 1 – Descrição da espécie e a quantidade de amostras colhidas de propriedades localizadas no Estado do Paraná, para determinação da sorologia do VLA 40

Tabela 1 – Números absolutos e relativos de ruminantes soropositivos e soronegativos para o ensaio imunoenzimático (ELISA), de 24 propriedades do Estado do Paraná 43

Tabela 2 – Freqüências relativas de soroprevalência ao Vírus da Língua Azul por espécie ruminante no Paraná, 2010 44

Tabela 3 – Números absolutos e relativos de amostras totais e soropositivas para o VLA, em ruminantes de propriedades do Estado do Paraná 45

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitros

ABIEC – Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne

ANOVA – *Analysis of Variance*

BT – *Bluetongue*

BTV – *Bluetongue Virus*

C. - *Culicoides*

cELISA – *Competitive Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

CEPANZO – Centro Panamericano de Zoonoses

dsRNA – Ácido ribonucléico de fita dupla

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

GMC – Grupo Mercado Comum

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDGA – Imunodifusão em Gel de Ágar

IFI – Imunofluorescência indireta

Km – Quilômetros

LA – Língua Azul

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

mL – Mililitros

mm – Milímetros

N – Norte

nº - Número

NS1 – 3 – Proteína não estrutural - 3

°C – Graus Celsius

OIE – *Office International des Epizooties*

pH – Potencial Hidrogeniônico

RES – Resolução

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

S – Sul

VLA – Vírus da Língua Azul

VMRD – *Veterinary Medical Research & Development*

VP 1 – 7 – Proteína viral 1 – 7

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1	13
O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM RUMINANTES DOMÉSTICOS – uma revisão	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (VLA).....	16
3. O VETOR DO VLA	17
4. DISTRIBUIÇÃO NO BRASIL	22
5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	23
6. REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2	34
SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM RUMINANTES DOMÉSTICOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL	34
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES UTILIZADAS NA PESQUISA E AMOSTRAGEM.....	39
2.2 COLHEITA DE AMOSTRAS	42
2.3 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA LÍNGUA AZUL.....	42
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4. CONCLUSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 3	53
CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DA ASPIRAÇÃO PARA PROJETOS DE PESQUISA COM INSETOS DE INTERESSE MÉDICO VETERINÁRIO	53
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MÉTODO DE ASPIRAÇÃO	57
3. RESULTADOS	59
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÃO.....	61
6. REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO 1

O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM RUMINANTES DOMÉSTICOS – uma revisão.

(Bluetongue virus in domestic ruminants – a review.)

O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM RUMINANTES DOMÉSTICOS – uma revisão.

(Bluetongue virus in domestic ruminants – a review.)

Ariane Paula Rovani Scolari¹, Rüdiger Daniel Ollhoff².

¹ Médica Veterinária, Esp., Mestrado em Ciência Animal, PUCPR.
scolariapr@gmail.com

² Médico Veterinário, Doutor, Professor do Mestrado em Ciência Animal, PUCPR.
ollhoff@gmail.com

RESUMO: A Língua Azul (LA) é uma doença viral não contagiosa de ruminantes, transmitida por artrópodes e economicamente importante. O Vírus da Língua Azul (VLA) pode causar doença severa em ovinos, mas raramente causa doença em bovinos, caprinos e na maioria dos ruminantes selvagens. De distribuição cosmopolita foi descrita pela primeira vez no Brasil por Silva em 1978, em bovinos e ovinos em São Paulo. Seguiram-se relatos da doença clínica nos Estados de SP, PR e recentemente no RS; e a presença sorológica do vírus em MG, RJ, PA, SP, CE, MS, PE, BA, e RS. No Paraná, o primeiro caso clínico foi identificado em 2002, em um único caprino. Desde então, nenhuma pesquisa foi realizada no Estado para investigar a circulação viral na região. A taxa de mortalidade e a severidade dos sinais clínicos são influenciadas pela espécie, raça e idade do animal infectado, pelo status imunológico do animal, pelo sorotipo e amostra do VLA, e por interações com o meio ambiente. Não existem vacinas disponíveis contra o VLA no mercado brasileiro e, apesar da presença do vírus em 12 Estados da confederação, nenhum programa de prevenção foi implementado. O estudo tem como objetivo realizar uma revisão da literatura especializada sobre o VLA demonstrando o estágio de conhecimento deste assunto no Brasil.

Palavras-chave: Doenças Virais. Ruminantes Domésticos. Brasil.

ABSTRACT: Bluetongue (BT) is an arthropod-borne, non contagious and economically important viral disease of ruminants with worldwide distribution. Bluetongue virus (BTV) can cause severe illness in some breeds of sheep and deer species, but rarely causes symptoms in cattle, goats and most of wild ruminants. In Brazil, BT was first described by Silva in 1978 in cattle and sheep in the State of São Paulo. Since then, viral circulation has been demonstrated in the States of Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Mato Grosso do Sul and in Paraná the first clinical case was identified in 2002 in goats. Mortality rate and severity of clinical signs depends upon species, breed and age, immunological status of the infected animal, sorotype and sample of BTV and also interactions with the environment. The study aims to conduct a review of scientific literature on BTV demonstrating the state of knowledge of this subject in Brazil.

Keywords: Viral diseases. Domestic Ruminants. Brazil.

1. INTRODUÇÃO

A Língua Azul (LA) é uma enfermidade infecciosa, viral, transmissível e não contagiosa, que acomete ruminantes selvagens e domésticos (ANDREWS *et al.*, 2008) como ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, veados e outros artiodátilos como os antílopes africanos (OIE, 2009). De acordo com MacLachlan (2004), esta enfermidade afeta os ruminantes de acordo com seu estado imunitário e nutricional, mas o “veado do rabo branco” (*Odocoileus virginianus*) e os ovinos da raça Merino são apontados como os mais susceptíveis.

O Vírus da Língua Azul (VLA) está presente em diversos países, estendendo-se entre as latitudes 40°-50° N e 35°S do globo terrestre, sendo encontrado principalmente em regiões que detêm condições favoráveis para a presença do seu vetor *Culicoides* como a África, as Américas e alguns países da Ásia e Oceania (GIBBS e GREINER, 1994; ANDREWS *et al.*, 2008).

Segundo MacLachlan (2004) deve ser enfatizado que a maioria das infecções de ovinos produz alterações pouco evidentes ou brandas, ocorrendo surtos clínicos somente quando ovinos suscetíveis são introduzidos em áreas endêmicas ou quando o vírus se propaga em populações sem prévio contato em regiões limítrofes entre áreas endêmicas e não endêmicas. Portanto, segundo Tomich (2007), a incidência da doença clínica é altamente variável.

Estudos da OIE (2008) apontam que a morbidade em ovinos pode chegar a 100%, com mortalidade geralmente entre 0 a 30%, podendo chegar a 70%, dependendo da raça, sorotipo e estresses ambientais. Nos bovinos, até 5% dos animais podem tornar-se doentes; contudo, apresentam taxa de mortalidade abaixo de 1%. A taxa de mortalidade e a severidade dos sinais clínicos são influenciadas pela espécie, raça e idade do animal infectado, pelo status imunológico, pelo sorotipo e amostra do VLA, e por interações com o meio ambiente (TOMICH, 2007). De acordo com o Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008), a LA possui notificação obrigatória. Walton *et al.* (1984) citam que em adição às perdas econômicas com a doença em si, a LA é usada como argumento para restringir a livre circulação internacional de animais, do germoplasma e dos produtos de origem dos mesmos. Portanto as conseqüências sócio-econômicas são graves, tendo sido incluída entre as seis doenças com o

maior risco sanitário para os rebanhos europeus dentro de um cenário de aumento no comércio internacional de animais e seus subprodutos e o aquecimento global (DUFOUR *et al.*, 2008). Na Holanda em 2006, a doença da LA causou perdas de 32,4 milhões de euros, principalmente devido às restrições no comércio internacional (VELTHUIS *et al.*, 2010).

2. O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (VLA)

O VLA é um vírus não envelopado, icosaédrico e pertencente ao gênero *Orbivirus*, um dos seis gêneros da família *Reoviridae*. O genoma viral consiste de 10 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) (ROY, 1989), que codificam sete proteínas estruturais (VP 1 – 7) e três não estruturais (NS 1 – 3), contribuindo para sua estabilidade (TOMICICH *et al.*, 2006, BATTEN *et al.*, 2008). Segundo a OIE (2008), o VLA é instável quando armazenado na presença de proteínas a uma temperatura de – 20°C e estável no congelamento a – 80°C ou inferior.

O VLA possui 24 sorotipos identificados, denominados de BTV-1 a BTV-24 (SCHWARTZ-CORNIL *et al.*, 2008). Os 24 sorotipos diferentes podem apresentar reações cruzadas entre si, sendo possível diferenciá-los por técnicas de soroneutralização ou por reações específicas de suas proteínas (VENDITTI, 2009). No Brasil, foram isolados os sorotipos 4 e 12; o sorotipo 4, foi descrito por Groocock e Campbell (1982) em bovinos importados do Brasil para os Estados Unidos e o sorotipo 12, em um caprino provindo do Estado do Paraná, isolado por Clavijo *et al.* (2002). Recentemente, Antoniassi (2010) encontrou ovinos clinicamente doentes com o sorotipo 12 no Estado do Rio Grande do Sul.

O VLA é transmitido aos ruminantes por vetores hematófagos, distribuídos entre as latitudes 40-50°N e 35°S, em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (GIBBS e GREINER, 1994; KONRAD *et al.*, 2003) do gênero *Culicoides* (LEANDER *et al.*, 2004).

Segundo DeMaula *et al.* (2002), o vírus infecta primariamente as células endoteliais do sistema vascular e do sistema linforeticular, com liberação de diferentes mediadores (interleucinas, ciclooxigenase, sintetase do óxido nítrico) e incremento na coagulação através de um aumento das tromboxanas. A infecção em

linfonodos locais produz a primeira viremia, infectando outros linfonodos, baço, medula e tecidos do organismo onde o vírus se replica no sistema micro-vascular resultando nas alterações patológicas características da doença (BREARD *et al.*, 2004). O vírus é disseminado através dos vasos linfáticos eferentes a uma variedade de tecidos de todo o corpo; para sítios de replicação secundária, como por exemplo os órgãos do sistema linfóide: baço, linfonodos e pulmões alcançando na seqüência a corrente sanguínea (DAL POZZO *et al.*, 2009), ligando-se a plaquetas e eritrócitos onde poderá ser capturado pelo vetor (MacLACHLAN *et al.*, 2009).

3. O VETOR DO VLA

Segundo Jennings e Mellor (1988), o VLA é transmitido entre os seus hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae).

Os *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) são dípteros pequenos, que medem de um a quatro milímetros de comprimento, com pernas relativamente curtas e robustas, principalmente o par anterior. Os adultos podem ter coloração cinza a castanho-escuro; o tórax apresenta corcova dorsalmente coberta com marcas pretas em muitas espécies. A cabeça é pequena e os olhos são proeminentes, as asas são curtas e relativamente largas, cobertas de cerdas microscópicas. A boca é bem desenvolvida, com estiletos afiados na mandíbula alongada, a qual é adaptada para sugar (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Algumas espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) buscam o repasto sanguíneo durante o dia até mesmo sob forte radiação solar, mas a maioria das espécies prefere o crepúsculo ou a noite como períodos de alimentação (SILVA *et al.*, 2010).

Os primeiros trabalhos objetivando a identificação de dípteros *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Brasil foram realizados na década de 60 (GOMES, 1987). No país, estes mosquitos são denominados “maruim”, “mosquito pólvora” e “mosquito do mangue” ou “borrachudo” (PINHEIRO *et al.*, 2003). O fato de serem identificados por nomes populares indica, segundo LAENDER *et al.* (2004), que eles são suficientemente conhecidos e possivelmente danosos para serem distinguidos de outros dípteros hematófagos. A importância epidemiológica dos *Culicoides*

(Diptera: Ceratopogonidae) no território brasileiro está na função que algumas espécies desempenham como vetores não apenas do VLA, mas ainda enfermidades humanas como o vírus da febre oropouche, que infectou de 1961 a 1996, mais de 500 mil pessoas somente na Amazônia brasileira (BARROS *et al.*, 2007) e as dermatozoonoses, avaliadas por Sherlock e Guitton (1965), entre os anos de 1954 a 1961, em 244 pacientes com lesões de pele no Hospital das Clínicas da Universidade Federal da Bahia. Em ovinos no Rio Grande do Sul, *C. insignis* foi considerado causador de uma dermatite alérgica sazonal por Corrêa *et al.* (2007).

O reconhecimento de espécie de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) competentes nos diferentes ecossistemas do mundo é um fator crítico para o entendimento da epidemiologia do VLA (MELLOR, 1996). A importância destes mosquitos para a saúde tem sido descritas por autores como Mellor *et al.* (2000) e Perruolo (2006).

Walton *et al.* (1984) citam que a transmissão primária do VLA nos EUA ocorreu através de um vetor chamado *Culicoides variipennis*. Fassotte *et al.* (2008) encontraram antes e durante um epidemia de LA na Bélgica as seguintes espécies transmissoras do vírus: *C. achrayi*, *C. deltus*, *C. lupicaris* e *C. newsteadi*. Mehlhorn (2009) monitorando os principais transmissores do VLA na Alemanha encontrou *C. obsoletus* e *C. pulicaris*; assim como Omeragić *et al.* (2009) que responsabilizaram o *C. obsoletus* como principal transmissor do VLA na Bósnia Herzegovina, após a primeira ocorrência da doença no país em 2002. A identificação da espécie ocorreu apenas em 2007. Griffioen *et al.* (2010) capturaram 6.210 mosquitos, destes, 54,1% foram identificados como *C. chiopterus* e 42,7% como *C. obsoletus*.

Existem mais de 1440 espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), mas apenas 17 (TOMICH *et al.*, 2006) a 30 (MacLACHLAN, 2010) estão associados com a transmissão do VLA. Na Amazônia Brasileira, Veras e Castellon (1998) capturaram 2.046 espécimes de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), sendo o mais capturado o *C. fusipalpis*, seguindo por *C. pseudodiabolicus* e *C. foxi*; entretanto, nenhum destes foram relacionados à transmissão do VLA. Laender (2002) capturou oito espécies transmissoras do vírus no Estado de Minas Gerais, sendo o *C. insignis* a espécie mais encontrada. No Pará, Trindade e Gorayeb (2005) colheram apenas 18 *C. insignis* de um total de 4003 mosquitos. Apesar da suposta condição favorável para o desenvolvimento dos *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) na planície pantaneira, Leander (2002) afirma que nenhum

trabalho, nesse sentido, ainda foi realizado nessa região. Ainda, observa-se que a fauna de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Brasil ainda está insuficientemente estudada, prevalecendo, no entanto a identificação do *C. insignis* do norte ao sul brasileiro.

Uma vigilância ativa da influência climática no movimento do vetor é a ferramenta mais importante para a avaliação de risco. A análise meteorológica permite examinar o padrão de vento, para avaliação do risco de dispersão a curto prazo, e o padrão isotérmico, para avaliação a longo prazo (GIBBS e GREINER, 1994). Segundo Mellor *et al.* (2000), a extensão do vôo dos *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) é usualmente curta e a maioria das espécies se dispersa por um pouco mais que 2 a 3 quilômetros dos sítios de criação.

Um outro fator importante para o desenvolvimento do vetor relatado por Lobato (1999) é a umidade, necessária ao desenvolvimento das fases larval e de pupa dos *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), sendo os ovos depositados em ambientes alagados e com alto grau de matéria orgânica, ou em águas limpas de alta salinidade ou alcalinidade. São locais de eleição para a reprodução desses vetores pântanos, terrenos irrigados, cochos, cavidades de árvores, frutas em putrefação, solo úmido, áreas lamacentas e áreas de escoamento fecal ao redor das fazendas.

O controle da LA deve ser feito de duas formas: interrompendo o ciclo dos vetores ou tornando os hospedeiros não susceptíveis à infecção pelo vírus por meio da vacinação. Para o controle do vetor podem ser tomadas medidas de modificação ambiental que visam à eliminação dos sítios de reprodução dos mosquitos, como eliminação de áreas pantanosas e buracos onde se acumula água (LOBATO, 1999). Com o mesmo objetivo, também podem ser utilizados inseticidas de uso sistêmico ou tópico nos hospedeiros ou de uso externo em ambientes como estábulos. Porém essa prática tem efeito temporário. A utilização de larvicidas em águas empossadas igualmente foi recomendada (BREARD *et al.*, 2004).

Carpenter *et al.* (2008), em recente pesquisa sobre métodos de prevenção e eliminação de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), concluíram que para a prevenção e o controle da doença da LA, deve-se aplicar inseticidas no ambiente; utilizar de redes ou de telas impregnadas de inseticidas; aplicar inseticidas nos animais; utilizar repelentes e estabular os animais; além de destruir os locais de criação dos mosquitos.

Conforme Wittmann e Baylis (2000), também no Reino Unido, a distribuição do VLA está restrita às áreas onde estão presentes espécies do vetor e número suficiente de hospedeiros susceptíveis, e a transmissão da doença está limitada ao período do ano em que as condições climáticas favorecem o aumento da população do vetor e a atividade (vô e repasto sanguíneo) dos insetos adultos.

Vandenbussche *et al.* (2008) comparou o teste de competição de ELISA com RT-PCR e comprovou que ambos os ensaios são igualmente específicos (RT-PCR: 98,5% e cELISA: 98,2%), entretanto a sensibilidade diagnóstica do RT-PCR (99,5%) foi superior à do cELISA (87,8%). Billinis *et al.* (2001) compararam a eficácia dos testes de RT-PCR duplex e isolamento viral em ovos de galinha embrionados em 36 amostras de sangue de ovinos e caprinos naturalmente infectados pelo VLA, e concluíram que 17 amostras foram positivas para o RT-PCR duplex e 13 para o isolamento, indicando que o RT-PCR duplex pode ser uma técnica útil para o monitoramento da infecção do VLA a campo.

O diagnóstico direto da doença pode ser realizado pela inoculação do material suspeito em ovos de galinha embrionados e em ovinos susceptíveis. O vírus também pode ser cultivado em diferentes linhagens celulares (MARTIN e ZWEERINK, 1972), onde especificamente as células endoteliais bovinas (WECHSLER e McHOLLAND, 1988) foram mais susceptíveis. Barratt-Boyes e MacLachlan (1994) isolaram com maior frequência o VLA em hemácias e plaquetas, mas nunca de granulócitos e raramente a partir do plasma durante a viremia. O vírus foi consistentemente isolado de eritrócitos no fim do curso de viremia. Na Bélgica, em 2007, foram estudadas 169 doses de sêmen de ovinos quanto a características microscópicas, concentração, motilidade e porcentagem de vivos e mortos, concluindo-se que todas as características seminais mudam significativamente, quando o animal está infectado pelo VLA (KIRSCHVINK *et al.*, 2009). Na Alemanha, o sêmen de bovinos infectados pelo VLA tipo oito foi avaliado e concluiu-se que não houve efeito sobre o volume e a concentração espermática, mas sim sobre a motilidade dos espermatozoides após o descongelamento, mesmo que o vírus não tenha sido isolado no sêmen através de reação em cadeia de polimerase (MÜLLER *et al.*, 2010).

Arita (1990) afirma que as técnicas de IDGA (imunodifusão em gel ágar) e IFI (imunofluorescência indireta) podem ser utilizadas na rotina laboratorial como instrumento para uma avaliação real da situação epidemiológica da LA no nosso

meio. A IFI oferece a vantagem adicional da possibilidade de ser utilizada para detecção de antígenos virais em cultivos celulares inoculados pelo VLA. Devido a baixa especificidade do teste de IDGA, existe a possibilidade de haver reações cruzadas. Essas reações ocorrem com outros *Orbivirus* ou com anticorpos do hospedeiro contra proteínas celulares utilizadas na preparação do antígeno (LAGER, 2004).

De acordo com Riet-Correa *et al.* (1996), é possível que infecções com outros *Orbivirus* de origem silvestres e de patogenicidade desconhecida ou nula, gerem respostas sorológicas cruzadas, devido a antígenos grupo-específico comuns.

Em bovinos, após a infecção com VLA, desenvolve-se a resposta imune humoral, que pode ser detectada de 14 a 28 dias. Os anticorpos neutralizantes podem ser detectados nos testes sorológicos, até três anos após a infecção (KONRAD *et al.*, 2003).

A IDGA e o teste de ELISA tem sido usados na vigilância epidemiológica e para emissão de certificados para comércio internacional de animais e de seus produtos segundo o Manual Padrão para Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2008; Resolução MERCOSUL/GMC/RES nº. 16/05).

Venditti (2009) trabalhou com o diagnóstico sorológico da Língua Azul em ovinos e bovinos da região Sudeste do Brasil e observou que o número de animais reagentes na prova de ELISA foi superior ao da prova de IDGA; a diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato do ELISA ser sabidamente mais sensível que a IDGA. Houve 19 ovinos reagentes ao IDGA e não reagentes ao ELISA, fato que pode ser explicado pela falta de especificidade do IDGA, tendo em vista que essa prova detecta outros orbivírus. Afirma ainda que, o ELISA é específico para todos os sorotipos de LA, indicando que o animal teve contato com uma cepa do vírus, mas não é capaz de identificar qual é esta cepa.

Para a prevenção da doença, Veronesi *et al.* (2010) citam que atualmente, dois tipos diferentes de vacinas contra o VLA são utilizadas; a inativada monovalente e a composta de vírus vivos modificados.

4. DISTRIBUIÇÃO NO BRASIL

Segundo Clavijo *et al.* (2002), o primeiro isolamento viral no Brasil data de 1980, sendo o sorotipo quatro em bovinos que foram exportados para os Estados Unidos, sendo que 13,3% (8/60) produziram anticorpos contra o VLA durante o período de quarentena no país de destino e foram sacrificados. Após isso, em 2001, num município pertencente à região metropolitana de Curitiba, no Estado do Paraná, os autores isolaram o sorotipo 12 do VLA, inoculando sangue de animais sintomáticos em ovos embrionados durante um surto ocorrido em abril, com 21 ovelhas e um caprino que demonstraram sinais clínicos da doença. No surto, dois ovinos e um caprino vieram a óbito pela doença; outros 128 ovinos e dois caprinos remanescentes foram sacrificados. Esta foi a primeira confirmação através de isolamento viral da manifestação clínica no país e na América do Sul.

Portanto, sabe-se apenas que em território nacional, circulam os sorotipos quatro e 12 do VLA, entretanto, maiores pesquisas são necessárias para o reconhecimento de outros sorotipos e o estabelecimento de associações entre sinais clínicos, patogenias e formas de prevenção.

Diversos estudos sorológicos em diferentes regiões do Brasil demonstram que o VLA encontra-se distribuído em todo o território brasileiro. Uma compilação dos autores brasileiros que estudaram através da sorologia a presença do vírus da LA nos animais encontra-se no quadro um. Observa-se que a soroprevalência na espécie bovina variou de 0,6 a 76 %, na espécie caprina de seis a 44 % e na espécie ovina houve a maior variabilidade de 0,1 a 100 % de animais soropositivos nos diferentes estudos brasileiros.

AUTOR	ESTADO	ESPÉCIE	POSITIVOS
Moreira <i>et al.</i> (1980)	Minas Gerais	Bovina	74%
Cunha <i>et al.</i> (1982)	Rio de Janeiro	Bovina	41%
Abreu (1982)	Roraima	Bovina	16%
Abreu (1982)	Amazonas	Bovina	26%
Abreu (1982)	Pará	Bovina	33%
Abreu (1982)	Pará	Bovina	21%
Cunha <i>et al.</i> (1987)	Paraná	Bovina	20%
Cunha <i>et al.</i> (1987)	São Paulo	Bovina	54%
Cunha <i>et al.</i> (1987)	Santa Catarina	Bovina	37%
Cunha <i>et al.</i> (1987)	Rio Grande do Sul	Bovina	1%
Cunha <i>et al.</i> (1988)	Rio de Janeiro	Caprina	44%
Cunha <i>et al.</i> (1988)	Rio de Janeiro	Ovina	24%
Silva <i>et al.</i> (1988)	Minas Gerais	Caprina	6%
Arita <i>et al.</i> (1992)	São Paulo	Ovina	53%
Castro <i>et al.</i> (1992)	Minas Gerais	Bovina	76%
Lobato <i>et al.</i> (2001)	Minas Gerais	Ovina	65%
Lobato <i>et al.</i> (2001)	Minas Gerais	Caprina	42%
Costa (2000)	Rio Grande do Sul	Ovina	0,1%
Costa (2000)	Rio Grande do Sul	Bovina	0,6%
Frota <i>et al.</i> (2001)	Ceará	Ovinos	13,6%
Silva (2002)	Ceará	Caprina	31%
Konrad <i>et al.</i> (2003)	Minas Gerais	Bovinos	59,5%
Costa <i>et al.</i> (2006)	Rio Grande do Sul	Ovinos	-0,1%
Costa <i>et al.</i> (2006)	Rio Grande do Sul	Bovinos	0,6%
Alves <i>et al.</i> (2008)	Paraíba	Ovina	4,1%
Nogueira (2008)	São Paulo	Ovina	65%
Motta (2009)	Pernambuco	Ovinos	27,5%
Motta (2009)	Pernambuco	Caprinos	24,3%
Tomich <i>et al.</i> (2009)	Mato Grosso do Sul	Ovina	10,9%
Tomich <i>et al.</i> (2009)	Mato Grosso do Sul	Bovina	42%
Tomich <i>et al.</i> (2009)	Mato Grosso do Sul	Veados campeiros	0%
Venditti (2009)	São Paulo	Ovinos	19,3%
Venditti (2009)	São Paulo	Bovinos	74,1%
Antoniassi (2010)	Rio Grande do Sul	Ovinos	100%

QUADRO 1 – Porcentagem de animais soropositivos para o VLA, em diferentes espécies ruminantes ordenados cronologicamente e por Estados brasileiros. Adaptado de LOBATO (1999).

5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Uma vez detectada, a LA apresenta conseqüências sócio-econômicas ou sanitárias graves, com repercussão severa no comércio internacional de animais e produtos de origem animal, sendo que, uma vez introduzida em um determinado país, a possibilidade de sua erradicação é pequena (KONRAD *et al.*, 2003).

Segundo Tomich *et al.* (2009), as principais conseqüências econômicas da infecção pelo VLA são perdas indiretas devido ao aborto, queda do desempenho

reprodutivo e na produção de leite, e perda de condição corporal, além da restrição internacional de movimentação animal.

Recentemente, Saegerman *et al.* (2010) estudaram 476 ovinos e 26 fetos abortados por 300 ovelhas durante 7 meses e concluíram que a infecção transplacentária ocorre em animais naturalmente infectados pelo VLA de sorotipo 8. O desempenho reprodutivo deste rebanho diminuiu consideravelmente: 25% das ovelhas abortaram e a taxa de fertilidade caiu para 50%.

Supõe-se que as restrições impostas por países importadores de produtos derivados de bovinos e ovinos, a imposição de testes para a exportação de animais e sêmen, bem como as próprias perdas diretas nos rebanhos afetados, causam um grande impacto econômico em nosso país, porém não encontramos na literatura consultada dados numéricos financeiros a esse respeito.

A movimentação do rebanho, entre países vizinhos, componentes do Mercosul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) exige uma análise obrigatória da presença do VLA ou anticorpos (sorologia) nos animais ou em seus produtos (Resolução MERCOSUL/GMC/RES Nº. 16/05).

Segundo Alves *et al.* (2008), as perdas econômicas causadas pela LA estão ligadas às restrições na importação e exportação de animais e de seu material genético, e aos transtornos reprodutivos associados a esta doença. Além destes, o fato do bovino tomar o papel de reservatório, aliado ao cuidado dos outros países com focos de infecção e contaminação biológica dos produtos, dificultam o comércio na Mercosul, nos EUA e na Europa.

O Brasil tem enorme potencial de produção e exportação de carnes, sêmen e embriões, contudo, diante da proliferação de barreiras sanitárias no comércio internacional, existe a necessidade de reforçar a confiança junto aos importadores de modo a garantir a segurança das relações comerciais. Nesse sentido, um programa de fiscalização sanitária mais eficiente (na produção, no abate, transporte e comercialização) e investimentos estruturais (laboratórios, pessoal técnico, vacinação, pesquisas, rastreabilidade e acompanhamento das questões sanitárias no comércio multilateral e regional), são elementos indispensáveis para a conquista de novos mercados e o fortalecimento do produto nacional naqueles previamente conquistados (VENDITTI, 2009).

Portanto, observa-se que a LA é uma doença que sabidamente acomete os ruminantes domésticos e silvestres do Brasil, entretanto, faltam informações no país

sobre a epidemiologia e a ocorrência da mesma. Países europeus combatem a doença e tentam restringir ao máximo a circulação viral, desenvolvendo formas preventivas como tentativa de evitar o contágio dos seus rebanhos, como por exemplo, as vacinas.

Ainda assim, Noad e Roy (2009) explicam que, em um primeiro momento parece fácil desenvolver uma vacina contra o VLA, pois há muito é conhecido pela comunidade científica, que o antígeno viral proporciona imunidade suficiente ao animal; no entanto, a atenuação incompleta das vacinas tem sido associada ao efeito teratogênico que proporcionam, ainda, a doença da LA não é imunologicamente simples, existem 24 sorotipos diferentes e a proteção é conferida por sorotipo específico. Assim, um animal vacinado e protegido de um sorotipo não está protegido contra infecções subseqüentes com outros sorotipos virais. Segundo Savini *et al.* (2008), manifestações clínicas graves ocorreram em grande número de ovelhas que foram vacinadas contra o sorotipo 16 em países europeus.

Caso não sejam realizados esforços conjuntos de pesquisadores, produtores e governo no intuito de compreender em detalhes tanto a biologia dos vetores quanto a biologia viral do VLA no Brasil, estaremos continuamente sujeitos a sofrermos as conseqüências das barreiras sanitárias, além de aceitarmos a conviver com baixos índices produtivos em nossos rebanhos.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, V.L. **Prevalência de bovídeos reagentes à prova de imunodifusão para a Língua Azul na região norte do Brasil.** Belo Horizonte, 1982. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

ALVES, F.A.L.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; SILVA, W.; W.; SILVA, M.L.C.R.; LOBATO, Z.I.P.; CLEMENTINO, I.J. Soroprevalência e fatores de risco para língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 484-489, 2008.

ANDREWS, A.H; BLOWEY, R.W; BOYD, H.; EDDY, R.G. **Medicina Bovina – Doenças e Criação de Bovinos.** 2° Ed. São Paulo, ROCA, p. 608-610, 2008.

ANTONIASSI, N. A. B. **Aspectos Clínicos e Patológicos da Infecção pelo Vírus da Língua Azul em Ovinos no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ARITA, G. M. M. **Vírus da Língua Azul: estudo do antígeno viral, produzido a partir do sorotipo 4, para fins de diagnóstico sorológico**. Campinas, 1990. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Estadual de Campinas.

ARITA, G. M.; GATTI, M. S.; GERMANO, P. M.; PESTANA-DE-CASTRO, A. F. Comparison of indirect immunofluorescence with agar gel immunodiffusion for the diagnosis of bluetongue virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n.5, p. 503-508, 1992.

BARRAT-BOYES, S.M.; MACLACHLAN, N. J. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 361-371, 1994.

BARROS, V. L.L.; MARINHO, R. M.; REBÊLO, J. M. M. Ocorrência de espécies de *Culicoides latreille* (Diptera, Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2789-2790, 2007.

BATTEN, C.A.; SWAIN, A.J.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BIN-TARIF, A.; OURA, C.A.L. Bluetongue virus: European Community proficiency test (2007) to evaluate ELISA, RT-PCR detection methods with special reference to pooling of samples. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 3-4, 2008.

BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; SPYROU, V.; NOMIKOU, K.; MANGANA, O.; PANAGIOTIDIS, C. A.; PAPADOPOULOS, O. Bluetongue Virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. **Journal of Virological Methods**, v. 98, p. 77-89, 2001.

BREARD, E.; HAMBLIN, C.; HAMMOUMI, S.; SAILLEAU, C.; DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. The epidemiology and diagnosis of Bluetongue with particular reference to Corsica. **Research in Veterinary Science**, v.77, p.1-8, 2004.

CARPENTER, S.; MELLOR, P.S.; TORR, S.J. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. **Medical and Veterinary Entomology**, n. 22, p. 175-187, 2008.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; ABREU, J.J. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implication in international embryo trade. **Tropical Animal Health and Production.**, v.24, p.173-176, 1992.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J.W. Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America. **Veterinary Records**, v. 151, p. 301-302, 2002.

CORRÊA, T.G.; FERREIRA, J.M.; RIET-CORREA, G.; RUAS, J.L.; SCHILD, A.L.; GUIMARÃES, A. Seasonal allergic dermatitis in sheep in southern Brazil caused by *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 181-185, 2007.

COSTA, J.R.R. **Produção e padronização de antígenos para Língua Azul e prevalência nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Estado do Rio Grande do Sul.** Belo Horizonte, 2000, 51p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Universidade Federal de Minas Gerais.

COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMANN, G.P.; LEITE, R.C.; HADDADL, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Língua Azul em bovinos e ovinos do Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.273-275, 2006.

CUNHA, R. G; SOUZA, D.M; TEIXEIRA, A.C. Anticorpos precipitantes para o Vírus da Língua Azul em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. **Biológico**, v. 48, n. 4, p. 99-103, 1982.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D.M.; PASSOS, W.S. Anticorpos para o Vírus da Língua Azul em soros de bovinos do Estado de São Paulo e da região Sul do País. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 9, p. 121-124, 1987.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A.C. Incidência de anticorpos para o Vírus da Língua Azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. **Arquivos Fluminense de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 53-56, 1988.

Dal POZZO, F. D.; SAEGERMAN, C.; THIRY, E. Bovine infection with Bluetongue Virus with special emphasis on European serotype 8. **The Veterinary Journal**, n. 182, v.2, p. 142–151, 2009.

DeMAULA, C.D.; LEUTENEGGER, C.M.; BONNEAU, K.R.; MACLACHLAN, N.J. The Role of Endothelial Cell-Derived Inflammatory and Vasoactive Mediators in the Pathogenesis of Bluetongue. **Virology**, v. 296, p. 330–337, 2002.

DUFOUR, B; MOUTOU, F.; HATTENBERGER, A. M.; RODHAIN, F. Global change: impact, management, risk approach and health measures – the case of Europe. **OIE Scientific and Technical Review**, v. 27, p. 541–550, 2008.

FASSOTTE, C., J. C. DELECOLLE, R. CORS, T. DEFRANCE, R. DE DEKKEN, E. HAUBRUGE, AND B. LOSSON. *Culicoides* trapping with Rothamsted suction traps before and during the bluetongue epidemic of 2006 in Belgium. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 74–83, 2008.

FROTA, M.N.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; ARITA, G.M.M.; FERREIRA, R.C.S.; MELO, A.C.M.; ALMEIDA, N.C. Levantamento sorológico do Vírus da Língua Azul em ovinos do Estado do Ceará. **Ciência Animal**, v.11, n.2, p. 84-86, 2001.

GIBBS, E.P.J.; GREINER, E.C. The epidemiology of Bluetongue. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, n.3/4, p.207-220, 1994.

GOMES, A.C. Contribuições do laboratório de entomologia da Faculdade de Saúde Pública para o conhecimento de endemias brasileiras. **Revista de Saúde Pública**, v.21, n.3, p.163-166, 1987.

GRIFFIOEN, K.; GEMST, D.B.J.; PIETERSE, M.C.; JACOBS, F.; OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.S. *Culicoides* species associated with sheep in the Netherlands and the effect of a permethrin insecticide. **The Veterinary Journal**, p. 1-6, 2010.

GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.160-164, 1982.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. Plêiade/FAPESP, v. 1, p. 218, 2001.

JENNING. D.M.; MELLOR, P.S. The Vector Potential of British *Culicoides* Species for Bluetongue Virus. **Veterinary Microbiology**, v. 17, p. 1-10, 1988.

KIRCHVINK, N.; RAES, M.; SAEGERMAN, C. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 244–251, 2009.

KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o Vírus da Língua Azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 10, n. 1, p. 117-125. 2003.

LAENDER, J.O. **Língua Azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise de evidência clínica e sorológica e identificação de *Culicoides***. Belo Horizonte, 2002. 92p. Dissertação (Mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

LAENDER, J.O.; RIBEIRO, E.S.; GOUVEIA, A.M.G.; LOBATO, Z.I.P.; FELIPPE-BAUER, M.L. Levantamento das espécies de *Culicoides latreille*, 1809 (diptera: ceratopogonidae) encontradas nas mesorregiões norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, Minas Gerais, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v.11, n.1, p.145-157, 2004.

LAGER, I.A. Bluetongue Virus in South America overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v.40, p.89-93, 2004.

LOBATO, Z.I.P.; BARCELOS, M.A.C.; LIMA, F.; RIBEIRO, E.B.T.; YORINORI, E.H., GOUVEIA, A.M.G. Língua Azul em ovinos e caprinos na Região Mineira da SUDENE. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Buiatria, 2001, p.165.

LOBATO, Z.I.P. Língua Azul: a doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.515-523, 1999.

MacLACHLAN, N.J. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. **Veterinaria Italiana**, n. 40, p. 462–467, 2004.

MacLACHLAN, N.J.; DREW, C.P.; DARPEL, K.E.; WORWA, G. The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. **The Journal of Comparative Pathology**, v. 141, p.1-16, 2009.

MacLACHLAN, N.J. Global Implications of the Recent Emergence of Bluetongue Virus in Europe. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, n. 26, p.163–171, 2010.

MARTIN, S.A.; ZWEERINK, H.J.; Isolation and characterization of two types of bluetongue virus particles. **Virology**, v. 50, n. 2, p. 495-506. 1972.

MELLOR, P.S. *Culicoides*: vectors, climate change and disease risk. **Veterinary Bulletin**, v.66, n.4, p.301-306, 1996.

MELLOR, P.S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. *Culicoides* Biting Midges: their role as Arbovirus vectors. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 307-340, 2000.

MEHLHORN, H.; WALLDORF, V.; KLIMPEL, S.; SCHAUB, G.; KIEL, E.; FOCKE, R.; LIEBISCH, G.; LIEBISCH, A.; WERNER, D.; BAUER, C. Bluetongue disease in Germany (2007–2008): monitoring of entomological aspects. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 313-319, 2009.

MERCOSUL/GMC/RES Nº. 16/05. **REQUISITOS E CERTIFICADOS ZOOSANITÁRIOS PARA O INTERCÂMBIO DE ANIMAIS OVINOS ENTRE OS ESTADOS PARTES DO MERCOSUL (REVOGA RES GMC Nº 66/94)**. Disponível em: www.mercosur.int. Acesso: jan. 2010.

MOTTA, I. O. **Anticorpos contra vírus do grupo da Língua Azul em caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco e inferências sobre sua epidemiologia em regiões semi-áridas**. Recife, 2009. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco.

MOREIRA, E.C., SILVA, J.A., VIANA, F.C. Teste de imunodifusão para língua azul em alguns municípios do Brasil. In: Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, 9, 1980, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Núcleo de Acessoramento à Pesquisa, 1980. p.83.

MÜLLER, U.; KEMMERLING, K.; STRAET, D.; JANOWITZ, U.; SAUERWEIN, H. Effects of bluetongue virus infection on sperm quality in bulls: A preliminary report. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 402–403, 2010.

NOAD, R.; ROY, P. Bluetongue vaccines. **Vaccine**, n. 27, p. 86-89, 2009.

NOGUEIRA, A.H.C. **Prevalência da Língua Azul em ovinos da região de Araçatuba – São Paulo, Brasil**. Araçatuba, 2008, 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

NOGUEIRA, A.H.C.; PITUCO, E.L.M.; STEFANO, E. CURCI, V.C.L.M.; CARDOSO, T.C. Detecção de anticorpos contra o Vírus da Língua Azul em ovinos na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1271-1276, 2009.

OIE – Office International des Epizooties. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2008. Disponível em: www.oie.int. Acesso em: set. 2010.

_____ **Bluetongue And Epizootic Haemorrhagic Disease**. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Terrestrial Manual, p. 18 2009. Disponível em: www.oie.int. Acesso em: jan. 2011.

OMERAGIĆ, J.; VEJZAGIĆ, N.; ZUKO, A.; JAŽIĆ, A. *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Bosnia and Herzegovina – first report. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 563-565, 2009.

PERRUOLO, G. A new species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Venezuela. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 46, n. 2, p.115-118, 2006.

PINHEIRO, R.R; CHAGAS, A.A.S; ANDRIOLI, A; ALVES, F.S.F. Viroses de Pequenos Ruminantes. **Embrapa Caprinos**, n. 46, p.13-17, 2003.

RIET-CORREA F., MOOJEN V., ROEHE P.M. & WEIBLEN R. Viroses confundíveis com Febre Aftosa: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

ROY, P. Bluetongue virus genetics and genome structure. **Virus Research**, v. 13, p. 179–206, 1989.

SAEGERMAN, C.; BOLKAERTS, B.; BARICALLA, C.; RAES, M.; WIGGERS, L.; LEEUW, I.; VANDENBUSSCHE, F.; ZIMMER, J-Y.; HAUBRUGE, E.; CASSART, D.; CLERCQ, K.; KIRSCHVINK, N. The impact of naturally-occurring, trans-placental Bluetongue Virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. **Veterinary Journal**, n. 187, p. 72-80, 2010.

SAVINI, G.; MacLACHLAN, N.J.; SANCHEZ-VIZCAINO, J.M.; ZIENTARA, S. Vaccines against bluetongue in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, n.31, p. 101–120, 2008.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P. P. C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BREARD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.; ZIENTARA, S. Bluetongue Virus: virology, pathogenesis and immunity, **Veterinary Research**, p. 39-46, 2008.

SILVA, F.J.F. **Relatório sobre estudos de ocorrência de Língua Azul em São Paulo: relatório da comissão de estudos**. Brasília: Ministério da Agricultura. Portaria Ministerial, n.150, 1978.

SILVA, J.; MACHADO, T.M.M.; MODENA, C.M.; VIANA, F.G.; MOREIRA, E.C.; ABREU, V.L.V. Frequência de Febre Aftosa, Língua Azul e Leucose Enzoótica Bovina em cabras de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 960, p. 393-403, 1988.

SILVA, M.X. **Soroprevalência da Língua Azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades do Ceará**. Belo Horizonte. 2002. 83p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVA, F.D.F.; OKADA, Y.; FELIPPE-BAUER, M. L. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) da vila de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.3., p. 69-74, 2010.

TOMICH, R.G.P.; PELLEGRIN, A.O.; CAMPOS, F.S.; LOBATO, Z.I.P.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Epidemiologia do Vírus da Língua Azul em Rebanhos Bovinos. Comunicado técnico: **Embrapa Pantanal**, n. 85, p. 1-26, 2006.

TOMICH, R.G.P. **Processo saúde-doença de bovinos em rebanhos de assentamentos rurais do município de Corumbá, MS**. Belo Horizonte, 2007. 182p. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais.

TOMICH, R.G.P.; NOGUEIRA, M.F.; LACERDA, A.C.R.; CAMPOS, F.S.; TOMAS, W.M.; HERRERA, H.M.; LIMA-BORGES, P.A.; PELLEGRIN, A.O.; LOBATO, Z.I.P.; SILVA, R.A.M.S. PELLEGRIN, L.A.; BARBOSA-STANCIOLLI, E.F. Sorologia para o Vírus da Língua Azul em bovinos de corte, ovinos e veados campeiros no Pantanal sul-mato-grossense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1222-1226, 2009.

TRINDADE, R.L.; GORAYEB, I.S. Maruins (Ceratopogonidae: Diptera) do estuário do Rio Pará e do litoral do estado do Pará, Brasil. **Entomología y Vectores**, v.12, n.1, p.61-74, 2005.

VENDITTI, L.L.R. **Infecção pelo Vírus da Língua Azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil**. São Paulo, 2009. 77p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio), Instituto Biológico.

VANDENBUSSCHE, F.; VANBINST, T.; VERHEYDEN, B.; DESSEL, W.V.; DEMEESTERE, L.; HOUDART, P.; BERTELS, G.; PRAET, N.; BERKVENS, D.; MINTIENS, K.; GORIS, N.; CLERCQ, K. Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of Bluetongue Virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. **Veterinary Microbiology**, n. 129, p. 15–27, 2008.

VELTHUIS, A.G.J.; SAATKAMP, H.W.; MOURITS, M.C.M.; DE KOEIJER, A.A.; ELBERS, A.R.W. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 294–304, 2010.

VERAS, R. S.; CASTELLÓN, E. G. *Culicoides latreille* (Diptera, Ceratopogonidae) in Brazilian Amazon, efficiency of traps and baits and vertical stratification in the forest reserve Adolpho Ducke. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.1, 1998.

VERONESE, E.; DARPEL, K. E.; HAMBLIN, C.; CARPENTER, S.; TAKAMATSU, H-H.; ANTHONY, S.J.; ELLIOTT, H.; MERTENS, P.P.C.; MELLOR, P.S. Viraemia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated Bluetongue Virus vaccines serotypes 16 and 4. **Vaccine**, v. 28, p.1397–1403, 2010.

WALTON, T.E.; BARBER, T.L.; JONES, R.H.; LUEDKE, A.J. Epizootiology of Bluetongue Virus: Transmission cycle, vectors and serotypic distribution in the Americas. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 2, 379–388, 1984.

CAPÍTULO 2

SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM RUMINANTES DOMÉSTICOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

(Seroprevalence of Bluetongue virus in domestic ruminants of Paraná State, Brazil.)

SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM RUMINANTES DOMÉSTICOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

(Seroprevalence of Bluetongue Virus in domestic ruminants of Paraná State, Brazil.)

Ariane Paula Rovani Scolari¹, Rosária Regina Tesoni de Barros Richartz², Ricardo Pagnoncelli³, Zandreli Elis Catelli⁴, Saulo Henrique Weber⁵, Rudiger Daniel Ollhoff⁶.

¹ Médica Veterinária, Esp., Mestrado em Ciência Animal – PUCPR.
scolariapr@gmail.com

² Médica Veterinária, Mestre, Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, SEAB – PR.
rrichartz@seab.pr.gov.br

³ Médico Veterinário, Residente do Hospital Veterinário para Animais de Fazenda, PUCPR.
ricardopagnoncelli@hotmail.com

⁴ Médica Veterinária, autônoma, Londrina - Paraná.
zancatelli@gmail.com

⁵ Estatístico, Doutor, Engenharia Florestal, PUCPR.
sauloweber@gmail.com

⁶ Médico Veterinário, Doutor, Professor do Mestrado em Ciência Animal, PUCPR.
ollhoff@gmail.com

RESUMO: O estudo tem como objetivo buscar a porcentagem de animais que circulam com o anticorpo do Vírus da Língua Azul (VLA) no Estado do Paraná, através da identificação dos ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos) soropositivos para LA em propriedades de diferentes municípios distribuídos no Estado, além de identificar animais com sinais clínicos evidentes. Foram colhidas 276 amostras de sangue de animais aleatoriamente escolhidos (188 ovinos, 49 bovinos e 39 caprinos), a partir de 24 fazendas de 18 municípios. Para a sorologia, utilizou-se o teste de cELISA (VMRD, Inc.®), realizado no Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti". Das amostras colhidas, 47,46% foram soropositivas para LA (40,95% dos ovinos; 77,55% dos bovinos; e 41,02% dos caprinos). Em três municípios (Arapongas, Bituruna e Ponta Grossa) não detectou-se soropositividade na totalidade das amostras (n=53). Todas as amostras (n=37) obtidas em Cambé, Florestópolis, Guarapuava, Laranjeira do Sul e Marmeleiro resultaram em soropositivos para o vírus. Nos demais 12 municípios abordados houve uma variação da soropositividade entre um mínimo de 8,3% (Curitiba) e um máximo de 80 % (Alvorada do Sul). Por inspeção clínica, nenhum animal doente foi encontrado. Esses resultados sugerem que o VLA encontra-se disseminado pelo Estado do Paraná, ocasionando infecções inaparentes.

Palavras-chave: soroprevalência. Bovinos. Ovinos. Caprinos. Paraná.

ABSTRACT: The aim of this study was to identify the percentage of animals from Paraná State infected by Bluetongue Virus antibodies (BTV) in, through the serological testing of domestic ruminants (cattle, sheep and goats) for BTV in farms from different counties distributed through the State, as well as identifying clinically symptomatic animals. We collected 276 blood samples from randomly selected animals (188 sheep, 49 cattle and 39 goats), in 24 herds from 18 counties. For serology, cELISA (VMRD, Inc. ®), was used at the “Centro Diagnóstico Marcos Enrietti”. Of the samples, 47,46% were seropositive for BTV (40,95% of the sheep, 77,55% of the cattle and 41,02% of the goats). In three counties (Arapongas, Bituruna and Ponta Grossa) no seropositive animals (n=53) was detected. All samples (n=55) collected at the counties of Cambé, Florestópolis, Guarapuava, Laranjeiras do Sul and Marmeleiro were seropositive for BTV. Seropositivity varied at the remaining 12 counties between a minimum of 8,3% (Curitiba) and a maximum of 80%(Alvorada do Sul). As no clinical cases were observed in the flocks examined and no symptomatic animals reported, we conclude that the infections are inapparent and widespread in the State of Paraná.

Keywords: seroprevalence; Cattle; Sheep; Goat; Paraná.

1. INTRODUÇÃO

A Língua Azul (LA) é uma doença viral, não contagiosa (OIE, 2008), transmitida principalmente por vetores biológicos dípteros do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae); afetando ruminantes domésticos e silvestres (TOMICH *et al.*, 2009).

Os mosquitos transmissores do Vírus da Língua Azul (VLA) são pertencentes à família Ceratopogonidae, cujos membros são conhecidos como mosquitos pólvora ou maruins. Os adultos de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) não conseguem voar grandes distâncias, sendo encontrados geralmente próximos ao substrato larval. Entretanto, foi registrado um alcance de vôo de 4km para *C. variipenis* (LILLIE *et al.*, 1981). Os *Ceratopogonidae* contém 96 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (MARCONDES, 2001). As espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) estão distribuídas desde os trópicos até as regiões subárticas e quase todas alimentam-se do sangue de mamíferos e aves, causando picada dolorosa e veiculando importantes patógenos (GUIMARÃES *et al.*, 2001; CORRÊA, 2005).

As principais espécies transmissoras do VLA são *C. actoni* e *C. fulvus* (Austrália, leste e sudeste da Ásia), *C. brevitarsis* e *C. wadai* (Austrália e sudeste da Ásia) e *C. imicola* (África, países do mediterrâneo, sul e leste da Ásia). Conte *et al.* (2007) cita que no Sul da Europa o *C. imicola* é o principal vetor do VLA, seguido por *C. obsoletus* e *C. scoticus*. Na América Central e América do Sul, Kramer *et al.* (1985) e Mo *et al.* (1994) concordam que o *C. insignis* e *C. pusillus* são os principais vetores do VLA, sendo que os sorotipos 2, 3 e 6 foram detectados a partir de *C. insignis*, e os sorotipos 3 e 4 a partir do *C. pusillus*. No Brasil, estudos associando os *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) à transmissão do vírus não foram feitos até o presente (VENDITTI, 2009).

O VLA é um *Orbivirus* da família *Reoviridae*, não envelopado, icosaédrico, que apresenta 10 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) (ROY, 1989; OSBURN, 1994.; ARADAIB *et al.*, 2005). São mundialmente reconhecidos 24 sorotipos de VLA sorologicamente distintos, denominados BTV-1 a BTV-24, pouco elucidados em relação às manifestações clínicas nos animais (TOMICH, 2007). O vírus é capaz de se multiplicar em uma gama de tipos celulares diferentes, com grandes variações de

temperatura permitindo a infecção em ambos hospedeiros: mamíferos e insetos (MELLOR *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro relato da presença do vírus foi descrito por Silva (1978), que demonstrou a presença de anticorpos em bovinos e ovinos de propriedades do Estado de São Paulo e, a partir disto, vários inquéritos sorológicos foram realizados utilizando a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), indicando a presença do vírus em várias regiões do país (LOBATO, 1999; LAENDER, 2002). Com auxílio da técnica de soroneutralização, Cunha (1990) relataram a presença dos sorotipos 6, 14, 17, 19 e 20 entre a população de ruminantes domésticos no Brasil. Apenas em 2001 é que Clavijo *et al.* (2002) isolaram o sorotipo 12 do VLA através da inoculação de sangue e tecidos de ruminantes clinicamente doentes em ovos embrionados, de uma propriedade da região metropolitana de Curitiba, Paraná.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne – ABIEC, o Brasil tem um rebanho bovino de cerca de 190 milhões de cabeças, em contínuo crescimento e tem apresentado avanços nos índices de produtividade. O custo de produção do bovino brasileiro se situa dentre os mais baixos do mundo, o que traz uma grande vantagem competitiva, além do rebanho ser considerado como o maior rebanho comercial do mundo, intensificando a necessidade em manter-se uma vigilância ativa para a doença da Língua Azul nos rebanhos. Em complemento, a ovinocaprinocultura, em um contexto mundial, é uma atividade econômica presente em todos os continentes, com seus mais diferentes climas, solos e vegetação. Caracteriza-se como uma exploração pecuária de relativa expressão econômica para inúmeros países do globo terrestre onde é explorada em sistemas extensivos e com baixo nível de tecnologia (SILVA, 2004). No Brasil, o rebanho de pequenos ruminantes é concentrado nas Regiões Nordeste (55,0%) e Sul (34,5%) (IBGE 2001), determinando fonte de renda e de subsistência para os pequenos e médios produtores rurais, fundamental para a economia local de todas as regiões do país. Segundo o Censo Agropecuário da Produção Pecuária Municipal (IBGE, 2009), a população ovina do Brasil é de aproximadamente 16,81 bilhões de cabeças e de caprinos, 9,16 bilhões; no Estado do Paraná, encontra-se um rebanho estimado em 600 mil cabeças de ovinos e 180 mil de caprinos, e 4,7% do rebanho total de bovinos do país, justificando a relevância da pesquisa.

O trabalho tem como objetivo estudar a soroprevalência do VLA em ruminantes domésticos adultos de raças variadas e de ambos os sexos, no Estado do Paraná, através do ensaio imunoenzimático - ELISA.

Perante a importância das afirmações sobre a doença da LA, ressalta-se que este levantamento sorológico é o primeiro desta natureza a ser realizado no Paraná, devendo ser seguido por levantamentos de identificação do sorotipo viral circulante e estudos mais aprofundados da transmissão, em especial do papel do vetor nesta, para que haja possibilidade do uso futuro de vacinas e/ou da implementação de programas de controle da doença da LA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do estudo, foram utilizadas amostras de soro sanguíneo de ovinos, caprinos e bovinos, fêmeas e machos adultos, criados em diferentes tipos de regimes (intensivo, semi-intensivo e extensivo), pertencentes a propriedades distribuídas no território paranaense, entre o período de janeiro e junho de 2010.

2.1 LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES UTILIZADAS NA PESQUISA E AMOSTRAGEM

As amostras foram determinadas segundo os procedimentos preconizados pelo Centro Panamericano de Zoonose (CENPAZO, 1979). Estimou-se em 38,4% a prevalência do VLA na população a ser estudada, tendo como base a média das prevalências relatadas por Lager (2004), onde houve soroprevalência de 1,2% no Rio Grande do Sul, 89,7% em Sergipe, e nos Estados de Minas Gerais (76,3%), Rio de Janeiro (40,9%), São Paulo (53,7%) e Santa Catarina (37,8%). Admitiu-se a margem de erro de 20% e depositando-se nesse resultado um grau de confiança de 95%.

A amostragem foi determinada pela utilização da seguinte fórmula:

$$n = \frac{p \cdot (100-p) \cdot g^2}{(p \cdot e/100)^2}$$

onde:

n = número de amostras a serem utilizadas

g^2 = fator determinante do grau de confiança ($1,96^2 \approx 4$)

p = prevalência estimada

e = margem de erro admissível (20,00%)

$$n = \frac{38,4 (100 - 38,4) 4}{(38,4 \cdot 20/100)^2}$$

$$n = \frac{38,4 (61,6) 4}{(7,68)^2}$$

$$n = \frac{9461,76}{58,98}$$

$$n = 160,42$$

Com a finalidade de se obter uma amostra maior, ultrapassou-se este valor incluindo-se mais 116 amostras totalizando-se 276 soros sanguíneo (n = 276), de ruminantes domésticos colhidas de maneira aleatória, sem distinção de sexo e raça, assegurando-se apenas que fossem animais com idade superior a seis meses, baseado na arcada dentária, conforme trabalho realizado por Souza *et al.* (2010). Utilizaram-se, portanto, 39 caprinos (*Capra hircus*), 49 bovinos (*Bos taurus* e mestiços *Bos taurus x Bos indicus*) e 188 ovinos (*Ovis aries*), conforme demonstrado no quadro 1.

ESPÉCIE	QUANTIDADE DE AMOSTRAS
<i>Capra hircus</i>	39
<i>Bos taurus</i> e mestiços <i>Bos taurus x Bos indicus</i>	49
<i>Ovis aries</i>	188
TOTAL	276

Quadro 1 – Descrição da espécie e a quantidade de amostras colhidas de propriedades localizadas no Estado do Paraná, para determinação da sorologia do VLA.

As propriedades utilizadas para colheita de sangue dos animais para a pesquisa situam-se no Estado do Paraná, entre 25 e 29º de latitude Sul, com altitudes de 0 a 1300 metros (IAPAR, 2010), quantificadas a seguir e classificadas por município na figura 1: Alvorada do Sul (1), Antônio Olinto (1), Arapongas (1), Bela Vista do Paraíso (1), Bituruna (1), Cambé (1), Cascavel (2), Curitiba (1), Fazenda Rio Grande (3), Florestópolis (1), Francisco Beltrão (1), Guarapuava (2), Laranjeiras do Sul (1), Marmeleiro (1), Ponta Grossa (1), Renascença (2), São Mateus do Sul (1) e União da Vitória (2), totalizando 24 propriedades em 18 municípios do Estado do Paraná.

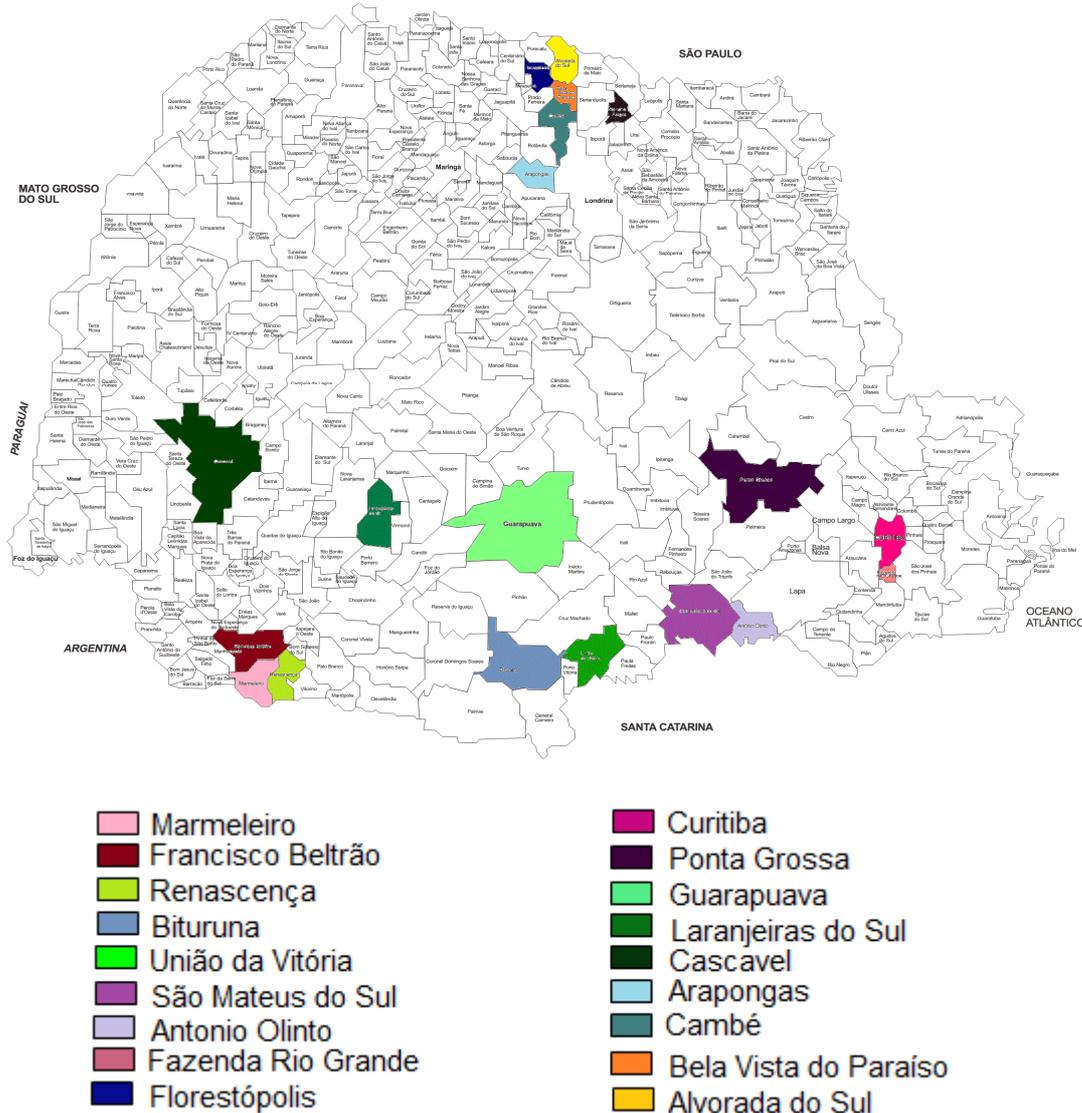


Figura 1- Mapa do Estado do Paraná, destaque em cores os municípios fornecedores de amostras de soro.

Os rebanhos dos municípios de Alvorada do Sul, Arapongas, Bela Vista do Paraíso, Cambé, Curitiba, Florestópolis, Francisco Beltrão, Guarapuava, Marmeleiro

e Renascença permanecem em regime semi-intensivo de produção, o restante dos rebanhos, em regime intensivo.

2.2 COLHEITA DE AMOSTRAS

Os animais foram escolhidos aleatoriamente em cada propriedade para comporem a amostragem da pesquisa. Antes da colheita do sangue, realizou-se rápido exame físico, com aferição da temperatura retal, observação de mucosas oculares e estimativa da idade perante observação da arcada dentária. Foram colhidas amostras de sangue total por punção da veia jugular dos ovinos e caprinos, por punção da veia ou artéria coccígea dos bovinos, utilizando-se agulhas 30X10 para os pequenos ruminantes e 40x12 mm para bovinos, após antissepsia com álcool iodado e gaze. O sangue foi armazenado em tubos individuais, siliconizados secos com a capacidade de 5 ml, identificados por propriedade.

Após a colheita, as amostras foram mantidas em repouso à temperatura ambiente até a completa retração do coágulo, para a separação da fração sérica. Posteriormente, o soro foi separado em novo tubo siliconizado seco e devidamente identificado, sendo conduzidos e mantidos em temperatura de congelamento de -20°C até o momento da realização do ensaio imunoenzimático (ELISA), no Laboratório de Virologia do Centro Diagnóstico “Marcos Enrietti”, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, localizado em Curitiba – Paraná.

2.3 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA LÍNGUA AZUL

Para a detecção de anticorpos no soro de ruminantes domésticos de propriedades do Estado do Paraná, foi utilizada o ELISA, conforme sugerido pela OIE (2004), utilizando o kit VMRD, Inc.® e seguindo suas especificações e as da OIE (2009). Quando comparada com a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), a

prova de Elisa se destaca pela maior sensibilidade e especificidade (AFSHAR *et al.*, 1989; KOUMBATI *et al.* 1999; VENDITTI, 2009).

As amostras, que estavam congeladas, foram colocadas em “banho-maria” para o descongelamento. Logo após, distribuiu-se 25µl de soro nos poços das microplacas, juntamente com 25 µl de soluções de controles positivos e negativos, na primeira coluna. Ainda, 25µl do conjugado peroxidase-anticorpo foi adicionado a cada amostra, permanecendo em descanso por 15 minutos em temperatura média entre 21º e 25ºC; em continuidade, lavou-se manualmente por três vezes cada microplaca e secou-se com papel toalha. Adicionou-se então, 50µl de substrato em cada poço, incubando-os durante 10 minutos em 21º a 25º C; adicionou-se então, 50µl *stop solution* e realizou-se a leitura no espectrofotômetro (Bio-Tek®), modelo ELX 800 GIDX.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se a análise descritiva simples com freqüências relativas, assim como a análise de variância (ANOVA) com teste de Bartlett para homogeneidade (PAGANO e GAUVREAU, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após a realização do ELISA, utilizando o kit VMRD, Inc.® na amostragem total de 276 ruminantes domésticos, criados em diferentes rebanhos e municípios do Estado do Paraná, foram de 47,46% de animais soropositivos para o VLA e 52,53% não reagiram, conforme a tabela 1. Este resultado distingui-se drasticamente do encontrado por Costa *et al.* (2006), em rebanhos de ovinos e bovinos de municípios do Rio Grande do Sul, onde 0,74% dos ovinos e 0,60% dos bovinos foram soropositivos. Entretanto, Nogueira (2009), encontrou 74,3% de ovinos soropositivos em Araçatuba – SP e Tomich *et al.* (2009),

encontrou com a sorologia 42% de bovinos e 10,9% de ovinos soropositivos e, 100% de veados campeiros soronegativos no Pantanal sul mato-grossense. Rizzo *et al.* (2010) encontrou 33,4% de ovinos soropositivos em São Paulo.

Tabela 1 – Números absolutos e relativos de ruminantes domésticos soropositivos e soronegativos para o ensaio imunoenzimático (ELISA), de 24 propriedades do Estado do Paraná.

Soropositivos	nº Absoluto	nº Relativo
Soropositivos	131	47,46%
Soronegativos	145	52,53%
TOTAL	276	100%

Na tabela 2, encontram-se as freqüências relativas de soroprevalência por espécie e, na tabela 3, os números absolutos e relativos de amostras totais e soropositivas para o VLA no Estado do Paraná.

Tabela 2 Freqüências relativas de soroprevalência por ELISA ao vírus da língua azul por espécie ruminante no Paraná, 2010.

	Soropositivos para VLA	Soronegativos para VLA	Freqüência relativa de positivos
Bovinos (n= 49)	38	11	77,55%
Caprinos (n= 39)	16	23	41,02%
Ovinos (n=188)	77	111	40,95%
TOTAL = 276			100%

As prevalências de animais soropositivos mensurados no total da amostra assim como nas diferentes espécies estão acima da soroprevalência inicial estimada que foi de 38,4 %. Nos bovinos, a soroprevalência de 77,55 % é maior que as soroprevalências mensuradas por Cunha *et al.* (1982), Abreu (1982), Cunha *et al.* (1987), Costa (2000), Konrad *et al.* (2003), Costa *et al.* (2006), Tomich *et al.* (2009) e semelhante aos valores obtidos por Moreira *et al.* (1980), Castro *et al.* (1992) e Venditti *et al.* (2009). Nos caprinos, a soroprevalência encontrada de 41,02 % é maior que as encontradas por Silva *et al.* (1988), Silva (2002) e Motta (2009) e semelhante aos valores encontrados por Cunha *et al.* (1988) e Lobato *et al.* (2001). Nos ovinos a soroprevalência encontrada de 40,95 % foi menor que os valores encontrados por Arita *et al.* (1992), Lobato *et al.* (2001), Nogueira (2008) e Antoniassi (2010), sendo no entanto maior que os resultados encontrados por Cunha *et al.* (1988), Costa (2000), Frota *et al.* (2001), Costa *et al.* (2006), Alves *et al.* (2008), Motta (2009), Tomich *et al.* (2009) e Venditti (2009). As variações

encontradas na literatura nacional referentes a soroprevalência podem refletir diferenças regionais da distribuição do vírus e de seu vetor, assim como diferenças de manejo e clima.

Tabela 3 – Números absolutos e relativos de amostras totais e soropositivas no ELISA para o VLA, em ruminantes de propriedades do Estado do Paraná.

Município	Absoluto total	Relativo total	Soropositivos absolutos	Soropositivos relativos
Alvorada do Sul	10	3,6%	8	80%
Antônio Olinto	6	2,1%	3	50%
Arapongas	5	1,8%	0	0%
Bela Vista do Paraíso	10	3,6%	4	40%
Bituruna	8	2,8%	0	0%
Cambé	9	3,2%	9	100%
Cascavel	13	4,7%	7	53,8%
Curitiba	12	4,3%	1	8,3%
Fazenda Rio Grande	43	15,5%	20	46,5%
Florestópolis	10	3,6%	10	100%
Francisco Beltrão	6	2,1%	3	50%
Guarapuava	18	6,5%	18	100%
Laranjeiras do Sul	6	2,1%	6	100%
Marmeleiro	12	4,3%	12	100%
Ponta Grossa	40	14,4%	0	0%
Renascença	32	11,5%	20	62,5%
São Mateus do Sul	7	2,5%	5	71,4%
União da Vitória	29	10%	8	27,5%
TOTAL	276	100%	133	100%

Observa-se pela tabela 3 que houve grande variação entre municípios em relação a soro-positividade das amostras. Os municípios de Arapongas, Bituruna e Ponta Grossa não tiveram animais soropositivos, entretanto, o município de Fazenda Rio Grande teve o maior índice, quando relaciona-se que 15,57% dos animais da amostra total são deste município e destes, 46,5 % reagiram ao ELISA. É notável que tanto nos municípios de Bituruna quanto no de Arapongas todos os animais amostrados foram ovinos, e em Ponta Grossa ovinos e caprinos, notadamente as espécies mais suscetíveis e que foram anteriormente abordadas no Paraná (CLAVIJO *et al.*, 2002).

Apesar de Costa *et al.* (2000) e Clavijo *et al.* (2002) afirmarem que as baixas temperaturas existentes na região Sul não favorecem a proliferação do vetor *Culicoides*, observou-se no trabalho que 47,46% dos animais testados tiveram contato com o VLA. É possível que outros animais ruminantes sirvam de reservatório

ou que ocorra a migração para esta região quando as temperaturas se tornam mais altas, como ocorreu com o surto descrito por Clavijo *et al.* (2002) em ruminantes no Paraná. Ainda, Baldet *et al.* (2008) também afirmam que o clima característico do norte da Europa no fim de agosto – baixas temperaturas e chuvas mais pesadas, teve impacto negativo sobre a população de *Culicoides* tanto na reprodução das larvas quanto dos adultos.

Os municípios de Arapongas, Bituruna e Ponta Grossa foram negativos para sorologia do VLA. Entretanto, cidades da mesma região geográfica demonstraram-se soropositivas, como por exemplo, União da Vitória, pertencente a mesma região geográfica de Bituruna. Ainda, Florestópolis, Alvorada do Sul, Bela Vista do Paraíso e Cambé, pertencentes à mesma região de Arapongas, com clima subtropical úmido, característico para a reprodução do vetor. Se existem diferenças nas populações de vetores nestes municípios e rebanhos, que justificariam a soronegatividade não nos foi possível avaliar.

Nos resultados obtidos por esta pesquisa, não houve diferença significativa entre o sistema de criação (semi-intensivo ou extensivo) sobre a soroprevalência de todos os ruminantes assim como dos ovinos pesquisados em maior número (PAGANO e GAUVREAU, 2004). Pode-se concluir que há 94,82% de chance das médias serem iguais (semi-intensivo = 58% e extensivo 57%) e verificando-se somente o maior grupo, constituído por ovinos, conclui que há 87,87 % de possibilidade das médias serem iguais (intensivo = 58% e extensivo 55%). Contudo, Costa (2000) e Alves *et al.* (2008) afirmaram em suas pesquisas que em semi-confinamento ou confinamento, há uma maior susceptibilidade ao vetor.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que há ruminantes soropositivos em todas as regiões pesquisadas do Estado do Paraná; há ruminantes soropositivos em 21 de 24 municípios paranaenses pesquisados; mais estudos epidemiológicos e clínicos são necessários para uma melhor compreensão da epidemiologia, patogenia e vetores no Estado do Paraná.

5. REFERÊNCIAS

AFSHAR, A.; THOMAS, F.; WRIGHT, P.F.; SHAPIRO, J.L.; ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting Bluetongue Virus antibodies in cattle and sheep. **Veterinary Record**, v. 124, n. 6, p. 136-41, 1989.

ABIEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Rebanho Bovino Brasileiro**, 2010. Disponível em: www.abiec.com.br. Acesso: jan. 2011.

ABREU, V.L. **Prevalência de bovídeos reagentes à prova de imunodifusão para a Língua Azul na região norte do Brasil**. Belo Horizonte, 1982. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

ALVES, F.A.L.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; SILVA, W.W.; SILVA, M.L.C.R.; LOBATO, Z.I.P.; CLEMENTINO, I.J. Soroprevalência e fatores de risco para Língua Azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 484-489, 2008.

ANTONIASSI, N. A. B. **Aspectos Clínicos e Patológicos da Infecção pelo Vírus da Língua Azul em Ovinos no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ARADAIB, I.E.; MOHAMED, M.E.H.; ABDALLA, T.M.; SARR, J.; ABDALLA, M.A.; YOUSOF M.A.M.; HASSAN, Y.A.; KARREN, A.R.E. Serogrouping of United States and some African serotypes of Bluetongue Virus using RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.145-150, 2005.

ARITA, G. M.; GATTI, M. S.; GERMANO, P. M.; PESTANA-DE-CASTRO, A. F.; Comparison of indirect immunofluorescence with agar gel immunodiffusion for the diagnosis of bluetongue virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n.5, p. 503-508, 1992.

BALDET, T.; DELE´COLLE, J.C.; CEˆTRE-SOSSAH, C.; MATHIEU, B.; MEISWINKEL, R.; GERBIER, G. Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the Bluetongue Virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 84–97, 2008.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; ABREU, J.J. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implication in international embryo trade. **Tropical Animal Health and Production.**, v.24, p.173-176, 1992.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J.W. **Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America**, p. 301-302, 2002.

CEPANZO – Centro Panamericano de Zoonosis. Procedimentos para estudios de prevalencia por muestro. **Nota técnica**, n. 18, 35 p., 1979.

CONTE, A.; GOFFREDO, M.; MEISWINKEL, R. Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *C. obsoletus* Complex in Italy. **Veterinary Parasitology**, n. 150, v. 4, p. 333-334, 2007.

CORRÊA, T. G. **Etiologia e epidemiologia da Dermatite Alérgica Sazonal em ovinos no sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas, 2005, 47p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Curso de Pós – Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas.

COSTA, J.R.R. **Produção e padronização de antígenos para Língua Azul e prevalência nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Estado do Rio Grande do Sul**. Belo Horizonte, 2000, 51p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Universidade Federal de Minas Gerais.

COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMANN, G.P.; LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o Vírus da Língua Azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 273-275, 2006.

CUNHA, R. G; SOUZA, D.M; TEIXEIRA, A.C. Anticorpos precipitantes para o Vírus da Língua Azul em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. **Biológico**, v. 48, n. 4, p. 99-103, 1982.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D.M.; PASSOS, W.S. Anticorpos para o Vírus da Língua Azul em soros de bovinos do Estado de São Paulo e da região Sul do País. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 9, p. 121-124, 1987.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A.C. Incidência de anticorpos para o Vírus da Língua Azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. **Arquivos Fluminense de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 53-56, 1988.

CUNHA, R. G. Anticorpos Neutralizantes em Soros de Ruminantes Domésticos do Brasil frente aos diferentes sorotipos do Vírus da Língua Azul. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.12, n.1, p.3-7, 1990.

FROTA, M.N.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; ARITA, G.M.M.; FERREIRA, R.C.S.; MELO, A.C.M.; ALMEIDA, N.C. Levantamento sorológico do Vírus da Língua Azul em ovinos do Estado do Ceará. **Ciência Animal**, v.11, n.2, p. 84-86, 2001.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. Plêiade/FAPESP, 218p, 2001.

IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná. **Zoneamento Agrícola**. Disponível em: www.iapar.br/. Acesso em: nov. 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pecuária 2001**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: jan. 2011.

_____ **Pecuária 2009**. Disponível em: www.ibge.gov.br/. Acesso em: nov. 2010.

KRAMER, W.L.; GREINER, E.C.; GIBBS, E.P.J. Seasonal variations in population size, fecundity, and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. **Journal of Medical Entomology**, n. 22, p. 163-169, 1985.

KOUMBATI, M.; MANGANA, O.; NOMIKOU, K.; MELLOR, P.S.; PAPADOPOULOS, O. Duration of Bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.277-285, 1999.

KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o Vírus da Língua Azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. **Revista da FZVA**, Uruguiana, v. 10, n. 1, p. 117-125. 2003.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in south America overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v.40, n.3, p.89–93, 2004.

LAENDER, J.O. **Língua Azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise da evidência clínica e sorológica e identificação de *Culicoides* spp.** Belo Horizonte, 2002. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

LILLIE, T.H.; MARQUART, W.C.; JONES, R.H. The flight range of *Culicoides varripennis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Canadian Entomology**, n. 113, p. 419-426, 1981.

LOBATO, Z.I.P. Língua Azul: a doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n. 4, p. 515–523, 1999.

LOBATO, Z.I.P.; BARCELOS, M.A.C.; LIMA, F.; RIBEIRO, E.B.T.; YORINORI, E.H., GOUVEIA, A.M.G. Língua Azul em ovinos e caprinos na Região Mineira da SUDENE. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Buiatria, 2001, p.165.

MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. Ed. Atheneu, p. 49-87, 2001.

MELLOR, P.S.; CARPENTER, S.; HARRUP, L.; BAYLIS, M.; MERTENS, P.P.C. Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 87, p. 4–20, 2008.

MO, C.L.; THOMSON, L.H.; HOMAN, E.J.; OVIEDO, M.T.; GREINER, E.C.; GONZALEZ, J.; SAENZ, M.R. Bluetongue Virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. **American Journal Veterinary Research**, n. 55, v. 2, p. 211–215, 1994.

MOTTA, I. O. **Anticorpos contra vírus do grupo da Língua Azul em caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco e inferências sobre sua epidemiologia em regiões semi-áridas**. Recife, 2009. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco.

MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C. Teste de imunodifusão para língua azul em alguns municípios do Brasil. In: Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, 9, 1980, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Núcleo de Acessoramento à Pesquisa, 1980. p.83.

NOGUEIRA, A.H.C. **Prevalência da Língua Azul em ovinos da região de Araçatuba – São Paulo, Brasil.** Araçatuba, 2008, 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

NOGUEIRA, A.H.C.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; CURCI, V.C.L.M.; CARDOSO, T.C. Detecção de anticorpos contra o Vírus da Língua Azul em ovinos na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1271–1276, 2009.

OIE – Office International des Epizooties. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 5th ed., p. 21-33, 2004.

_____. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** 2008. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: setembro de 2010.

_____. **Bluetongue And Epizootic Haemorrhagic Disease.** Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Terrestrial Manual, p. 18 2009.

OSBURN, B.I. Bluetongue virus. **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n.3, p.547-560, 1994.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios da Bioestatística.** São Paulo: Thomson, 2004. 522p.

RIZZO, H.; GREGORY, L.; MEIRA JR, E.B.S.; PIVA, F.M.; MATTOS, A.C.D.; LOBATO, Z.; HASEGAWA, M.Y. Incidência de Língua Azul em ovinos do Estado de São Paulo com histórico de problemas reprodutivos. In: Congresso Internacional da Feira Internacional de Ovinos e Caprinos – FEINCO, V, São Paulo. **Anais...** 2010.

ROY, P. Bluetongue Virus genetics and genome structure. **Virus Research**, v. 13, p. 179 – 206, 1989.

SOUZA, T.S.; COSTA, J.N.; MARTINEZ, P.M.; COSTA NETO, A.O.; PINHEIRO, R.R. Anticorpos contra o Vírus da Língua Azul em rebanhos ovinos da microrregião de Juazeiro, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 419-427, 2010.

SILVA, J.; MACHADO, T.M.M.; MODENA, C.M.; VIANA, F.G.; MOREIRA, E.C.; ABREU, V.L.V. Freqüência de Febre Aftosa, Língua Azul e Leucose Enzoótica

Bovina em cabras de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 960, p. 393-403, 1988.

SILVA, F.J.F. **Relatório sobre estudos de ocorrência de Língua Azul em São Paulo: relatório da comissão de estudos**. Brasília: Ministério da Agricultura. Portaria Ministerial, n.150, 1978.

SILVA, M.X. **Soroprevalência da Língua Azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades do Ceará**. Belo Horizonte. 2002. 83p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVA, R.C.P.A. A ovinocultura do Paraná no Contexto nacional e mundial: um breve diagnóstico situacional. **Informação técnica – SEAB**, 2004. Disponível em: www.seab.pr.gov.br. Acesso em: nov. 2010.

TOMICH, R.G.P. **Processo saúde-doença de bovinos em rebanhos de assentamentos rurais do município de Corumbá, MS**. Belo Horizonte, 2007. 182p. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais.

TOMICH, R.G.P.; NOGUEIRA, M.F.; LACERDA, A.C.R.; CAMPOS, F.S.; TOMAS, W.M.; HERRERA, H.M.; LIMA-BORGES, P.A.; PELLEGRIN, A.O.; LOBATO, Z.I.P.; SILVA, R.A.M.S. PELLEGRIN, L.A.; BARBOSA-STANCIOLLI, E.F. Sorologia para o Vírus da Língua Azul em bovinos de corte, ovinos e veados campeiros no Pantanal sul-mato-grossense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1222-1226, 2009.

VENDITTI, L. L. R. **Infecção pelo Vírus da Língua Azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil**. São Paulo, 2009. 77p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio), Instituto Biológico.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DA ASPIRAÇÃO PARA PROJETOS DE PESQUISA COM INSETOS DE INTERESSE MÉDICO VETERINÁRIO

*(Considerations of method for aspiration of research projects with insects of veterinary
medical interest)*

CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DA ASPIRAÇÃO PARA PROJETOS DE PESQUISA COM INSETOS DE INTERESSE MÉDICO VETERINÁRIO

(Considerations of method for aspiration of research projects with insects of veterinary medical interest)

Ariane Paula Rovani Scolari¹, Rüdiger Daniel Ollhoff², Mario Antonio Navarro da Silva³

¹ Médica Veterinária, Esp., Mestrado em Ciência Animal – PUCPR.
scolariapr@gmail.com

² Médico Veterinário, Doutor, Professor do Mestrado em Ciência Animal, PUCPR.
ollhoff@gmail.com

³ Biólogo, doutor, Professor da UFPR
mnavarro@ufpr.br

RESUMO: Vários métodos são utilizados para a captura de insetos hematófagos de importância médica veterinária. Diferentes equipamentos e formas de colheita são descritos na literatura com o intuito de conseguir capturar insetos capazes de serem identificados e em maior número possível. Os equipamentos são mais ou menos espécie específicos, facilitando estudos didáticos e científicos dos vetores de importantes doenças do contexto médico veterinário. Neste trabalho, foi utilizado como método de captura de insetos hematófagos a armadilha aspirativa com auxílio de iscas animais, como bovinos, ovinos e caprinos, em 7 propriedades aleatórias no Estado do Paraná, visando a captura de espécimes da família Ceratopogonidae. A captura foi bem sucedida somente em uma propriedade, discutindo-se as possíveis falhas e vantagens a partir do equipamento e da metodologia empregada.

Palavras-chave: vetores hematófagos, bovinos, Armadilha de aspiração.

ABSTRACT: Several methods are used to capture hematophagous insects of veterinary interest. Different equipment and harvesting methods are described in the literature in order to capture large amounts of insects that can be identified afterwards. The equipment is more or less species specific, facilitating scientific studies of vectors of important veterinary medical diseases. We used as a method of capturing hematophagous insects the trap aspiration with the aid of animal baits, including cattle, sheep and goats in 7 randomly chosen properties in the State of Paraná, in order to capture specimens of the family Ceratopogonidae. The capture was successful only in one farm, and possible failures and advantages of the equipment and methodology were discussed.

Key words: blood sucking vectors, cattle, Suction trap.

1. INTRODUÇÃO

Diversos insetos demonstram importância médica e médico-veterinária, uma vez que podem atuar na veiculação de patógenos ao homem e aos animais (MARCHIORI *et al.* 2000). Enfermidades causadas por maruins (*Culicoides* spp. Diptera: Ceratopogonidae) são conhecidos da literatura médica brasileira pelo menos desde o relato de Sherlock e Guitton (1965). Segundo Fallis (1980), *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) causam perdas econômicas significativas por transmitirem vírus e outros patógenos aos animais, causando doenças como a febre efêmera dos bovinos, língua azul (LA) e a oncocercose em várias espécies de ruminantes; e a peste eqüina, que matou milhares de cavalos na África, Ásia, Turquia e Espanha. De acordo com Diniz *et al.* (2006), mais de 50 arbovírus têm sido isolados de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no mundo, sendo a maioria membros da família *Bunyaviridae* (20 vírus), *Reoviridae* (19 vírus) e *Rhabdoviridae* (11 vírus). A identificação do vetor é crucial para a implementação de medidas integradas de controle e análise do risco da doença (VENTER *et al.*, 2009).

Para o estudo de insetos, utiliza-se de métodos e objetos para a captura dos mesmos, neste sentido, Rafael (2002) refere-se a excursões para observação de hábitos de insetos como a melhor forma para a elaboração de protocolos de captura deles. Ainda, cita que não existe um método que seja o mais eficiente para colheita, sendo que cada um apresenta suas vantagens e desvantagens, como: alguns são excelentes para se colher grandes números de insetos, enquanto outros são menos produtivos em quantidade, mas excelentes pela qualidade.

Um modelo de armadilha luminosa desenvolvido nacionalmente para a captura de pequenos insetos e testado em flebotomíneos foi descrito sob o nome "HP" por Pugedo *et al.* (2005). Quando comparada a armadilha CDC (Communicable Disease Center, Atlanta, USA), esta teve capacidade de colher quatro vezes mais flebotomíneos, podendo também ser indicada para trabalhos de entomologia.

Carpenter *et al.* (2008) descreveram a existência de vários métodos de captura destes mosquitos, como por exemplo armadilhas luminosas, armadilhas para captura de larvas, aspiradores e armadilhas montadas em veículos, que são utilizados em função do objetivo do estudo. Citam ainda que, para avaliar a quantidade de adultos, o método mais utilizado é a armadilha com luz ultravioleta,

enfatizando que estes métodos possuem limitadas utilizações, uma vez que não quantificam o número de insetos atraídos pelo odor dos hospedeiros, por exemplo.

Para a colheita de dípteros do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), Davies e Walker (1974) colheram 30 espécies deste gênero trabalhando no Quênia com armadilhas de sucção (aspirador) alimentada por dióxido de carbono. Veras e Castellón (1998), visando igualmente a captura do gênero *Culicoides*, utilizaram alguns tipos de armadilhas como do tipo Disney com iscas de gambá, roedores e galináceos; ainda do tipo CDC; armadilha suspensa e do tipo Malaise trabalhando na Amazônia. Destas, a armadilha do tipo CDC foi a que capturou maior número de espécimes com 98,6% de um total 2046 em 12 meses de captura. Entre os anos de 2000 e 2004, Conte *et al.* (2007) colheram 38.000 *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) com armadilha luminosa na Itália. No Maranhão, Barros *et al.* (2007) capturaram 2.874 espécimes com armadilhas luminosas do tipo CDC alimentadas com pilhas e instaladas sobre bois, jumentos, galinhas e gansos. Van der Rijt *et al.* (2008), utilizaram um aspirador de pó manual em nível baixo de potência para recolher os insetos após uso de um eqüino como isca numa armadilha de tenda. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) também foram capturados com eficiência por Fassotte *et al.* (2008) na Bélgica, com armadilhas de sucção do tipo Rothamsted. Meiswinkel *et al.* (2008) também tiveram sucesso ao capturar *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associados a transmissão do vírus da LA na Holanda utilizando armadilhas com luz negra do tipo Onderstepoort. Armadilhas de luz negra igualmente foram utilizadas no noroeste da Alemanha onde obteve-se bom resultado, totalizando 26 espécies diferentes de *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) (KIEL *et al.*, 2009). Recentemente, Trindade e Gorayeb (2010), em estudo desenvolvido no Pará, colheram 1.718 *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) com iscas humanas e armadilha luminosa do tipo CDC.

Este trabalho tem como objetivo descrever a utilização da armadilha do tipo aspirador para colheita de mosquitos hematófagos em ruminantes domésticos do Estado do Paraná.

2. MÉTODO DE ASPIRAÇÃO

A captura de insetos hematófagos realizou-se em propriedades rurais do Estado do Paraná. Como iscas foram utilizados ruminantes domésticos – bovinos, ovinos e caprinos, onde um ou dois animais eram contidos em troncos, cuidando para que o animal fosse posicionado de maneira confortável. Quando possível, conforme Lazovei (2001), eram levados até um local atrativo para a ação dos mosquitos hematófagos, como zonas de alta umidade, como banhados e lagoas.

O animal era preso por uma corda e/ou canzil, sendo aspirado sua superfície, primeiro nas porções mais baixas do corpo (membros) em seguida, por todo o corpo do animal, conforme figura 1.



Fig. 1 – Contenção de um bovino e captura de insetos sendo realizada através de aspiração.

As aspirações ocorreram uma vez em cada propriedade, entre as 16h30min até as 19h30min, conforme descrito por Van der Rijt *et al.* (2008), que cita hábitos crepusculares para os *Culicoides*, em noites quentes e úmidas (WITTMANN e BAYLIS, 2000; BARROS *et al.*, 2007; TRINDADE e GORAYEB, 2010). As capturas foram realizadas entre os meses novembro 2009 a janeiro de 2010. Durante o período de aproximadamente 3 horas, permaneceu-se com os animais iscas e no local apropriado e procedeu-se a aspiração. Inicialmente, esperava-se entre 20 a 30 minutos e iniciava-se a captura, primeiramente nos membros, e logo após, em

região rostral e caudal, seguindo para o restante do corpo do animal, realizando-se este procedimento de 10 em 10 minutos.

Para a captura propriamente dita, foi utilizado um aparelho de sucção tipo aspirador, que consistia de um tubo de PVC de 100 mm de diâmetro com 1 metro de comprimento, acoplado a um motor elétrico de 0,235 HP, que propulsionava uma hélice capaz de prover o fluxo de ar. O conjunto era acoplado a uma bateria de 12 V, permitindo que o aparelho fosse portátil. Ao final do tubo, encontrava-se um copo para aprisionamento dos insetos com tela de aço com espaçamento da malha de 0,5 mm. Ao redor deste copo era colocado uma meia elástica com tecido de elastano utilizado para aprisionar imediatamente os insetos após o desligamento do motor. A meia elástica era utilizada também como guia para inserção no frasco com éter para o sacrifício dos insetos. O aparelho é demonstrado na figura 2. Este aparelho é similar ao descrito por Natal e Marucci (1984).



Fig 2 – Aparelho do tipo aspirador utilizado para captura de insetos hematófagos em propriedades do Estado do Paraná.

Após a captura, os insetos sacrificados eram acondicionados em recipientes devidamente rotulados e imersos em solução com álcool 70%, conforme descrito por Dutra e Marinoni (1994) e levados para posterior identificação ao Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Paraná.

As tentativas de captura dos mosquitos pólvora foram realizadas concomitantemente à colheita de sangue de ruminantes domésticos de 24 propriedades de 18 municípios do Estado do Paraná, com o objetivo de realizar um levantamento sorológico do Vírus da Língua Azul (VLA) neste Estado. Os produtores eram abordados sem aviso prévio.

3. RESULTADOS

De 24 propriedades abordadas, somente 7 propriedades de 4 municípios paranaenses (Fazenda Rio Grande, Ponta Grossa, Renascença e Marmeleiro) permitiram a captura de insetos em sua propriedade. Ao mesmo tempo em que não houve problemas na colheita de amostras de sangue, os mesmos proprietários não permitiram o uso do aparelho aspirador sobre seus animais como iscas, negavam-se em concordar com a permanência da equipe técnica na propriedade, justificando que o horário era impróprio para o acompanhamento, por perturbar o manejo dos animais de produção na parte da tarde, ainda, podia notar-se a desconfiança ou incompreensão quanto aos objetivos de capturar os insetos. Quando aventado uma proposta de retorno em outro momento os produtores voltavam a negar a oferta.

Observou-se que em ovelhas lanadas, não era possível a captura dos insetos no corpo. Foi possível observar que os mosquitos voavam rapidamente no momento em que a armadilha era colocada próximo a eles, dificultando ainda mais a captura. Durante a tarefa, membros da equipe técnica foram picados pelos mosquitos *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), e observou-se dor intensa no local da picada, além de eritema e pápula.

Foram capturados insetos das famílias Brachycera, Tabanidade e Ceratopogonidae.

4. DISCUSSÃO

A metodologia utilizada foi eficaz em capturar diferentes insetos dípteros, porém pouco produtiva na captura de insetos da família Ceratopogonidae, sendo capturados somente dois indivíduos, embora outros métodos não terem sido utilizados de forma simultânea para comparação da densidade populacional de Ceratopogonidae nas áreas onde o procedimento de colheita foi autorizado.

Armadilhas do tipo CDC apresentaram melhores resultados quando utilizadas para captura de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), conforme relatado por Silva *et al.* (2010) trabalhando no Pará.

Apesar deste aparelho ser similar ao descrito por Natal e Marucci (1984), que obtiveram bons resultados em capturas de mosquitos Culicidae no intra- e peridomicílio, no ambiente aberto e no interior de matas, não pode-se repetir este sucesso ao tentar capturar mosquitos Ceratopogonidae.

As vantagens do aparelho de possuir a câmara de captura em posição anterior à hélice, o que evita a danificação do material colhido, a sua mobilidade, o baixo consumo de energia e o custo relativamente baixo não podem ser determinantes se o principal objetivo é a captura de *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). No entanto, o aparelho poderia ser usado para a captura de diversas outras espécies de insetos hematófagos de interesse médico-veterinário, à semelhança de outros aparelhos, tendo a vantagem de não estar sujeito à furtos como nas armadilhas fixas ou penduradas como os modelos utilizados por Dutra e Marinoni (1994), Meiswinkel *et al.* (2008) e Venter *et al.* (2009). A baixa quantidade de insetos capturados pode estar ligado tanto à presença de vento (CONTE *et al.* 2007), maior ou menor presença dos animais fora ou dentro dos abrigos conforme observado por Meiswinkel *et al.* (2008) ou a falhas no sacrifício dos animais (possibilidade de fuga) e aos movimentos de defesa dos ruminantes isca, que muitas vezes sentiam-se perturbados pela presença e passagem do aspirador próxima à sua superfície além do barulho do motor elétrico. A presença de animais hipersensíveis, apesar de não poder ser descartado, parece não ter sido fator de insucesso, mesmo que pudesse diminuir um pouco a quantidade capturada como relatado por Van Der Rijt *et al.* (2008).

A impossibilidade de usar o aspirador em mais de 83 % das propriedades e a desconfiança demonstrada pelos produtores, além de refletirem um desconhecimento da importância da entomologia veterinária evidenciam a necessidade do uso de outro tipo de abordagem e/ou aparelhos quando do levantamento da ocorrência de insetos hematófagos nas propriedades rurais paranaenses ou mesmo o aperfeiçoamento do equipamento no sentido de torná-lo mais silencioso. O barulho provocado pelo motor, no entanto, não foi o principal condicionante em reações de defesa dos animais isca, mas sim a necessidade do aparelho muitas vezes entrar em contato físico (encostar no) com o animal.

5. CONCLUSÃO

O modelo de armadilha por aspiração direta sobre o animal é capaz de capturar insetos hematófagos sendo necessários aperfeiçoamentos para torná-lo mais silencioso e ágil, para que se torne uma armadilha de uso corriqueiro para captura de Ceratopogonidae.

O método de aspiração da superfície dos animais, com aperfeiçoamentos aliado a outros métodos de captura podem auxiliar na determinação das espécies de dípteros importantes para saúde animal.

Os produtores rurais deveriam ter acesso a mais material de divulgação referente a metodologias entomológicas aplicadas ao campo, para diminuir-se a desconfiança e o preconceito de aparelhos e equipamentos utilizados na entomologia de campo.

6. REFERÊNCIAS

BARROS, V.L.L.; MARINHO, R.M.; REBELO, J.M.M. Ocorrência de espécies de Culicoides Latreille (Diptera, Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 23, n. 11, p. 2789-2790, 2007.

CARPENTER, S.; MELLOR, P.S.; TORR, S.J. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. **Medical and Veterinary Entomology**, v.22, p. 175–187, 2008.

CONTE, A.; GOFFREDO, M.; MEISWINKEL, R. Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *C. obsoletus* Complex in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 150, p. 333-334, 2007.

DAVIES, B.F.G.; WALKER, A.R. The distribution in Kenya of bluetongue virus and antibody, and the *Culicoides* vector. **Journal of Hygiene**, v. 72, p. 265-272, 1974.

DINIZ, J.A.P.; NUNES, M.R.T.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; CRUZ, A.C.R.; SOUZA, W. MEDEIROS, D.B.A.; CHIANG, J.O.; VASCONCELOS, P.F.C. Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* SPP) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus, Bracorhabdovirus. **Archives of Virology**, n.151, p. 2519–2527, 2006.

DUTRA, R.R.C.; MARINONI, R.C. Insetos capturados com armadilha Malaise na Ilha do Mel, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. I Composição de ordens. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, n. 2, p. 227-245, 1994.

FALLIS, A.M. Arthropods as pests and vectors of disease. **Veterinary Parasitology**, v. 6, p. 47-73, 1980.

FASSOTTE, C.; DELÉCOLLE, J.C.; CORS, R.; DEFRANCE, T.; DE DEKEN, R.; HAUBRUGE, E.; LOSSON, B. *Culicoides* trapping with Rothamsted suction traps before and during the bluetongue epidemic of 2006 in Belgium, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 74-83, 2008.

KIEL, E.; LIEBISCH, G.; FOCKE, R.; LIEBISCH, A. Monitoring of *Culicoides* at 20 locations in northwest Germany, **Parasitology Research**, v. 105, p. 351-357, 2009.

LAZOVEI, A. L. Culicídeos (Mosquitos). IN: MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. Ed. Atheneu, 2001, p. 59-103.

MARCHIORI, C.H.; CASTRO, M.E.V.; PAIVA, T.C.G.; TEIXEIRA, F.F.; SILVA, C.G. Dípteros muscóides de importância médica e veterinária e seus parasitóides em Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 350-353, 2000.

MEISWINKEL, R.; GOFFREDO, M.; DIJKSTRA, E.G.M.; van der VEM, I.J.K.; BALDET, T.; ELBERS, A. Endophily in *Culicoides* associated with BTV-infected cattle em the province of Limburg, south-eastern Netherlands, 2006. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 182-195, 2008.

NATAL, D.; MARUCCI, D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v. 18, p. 418-420, 1984.

PUGEDO, H.; BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; SILVA, J.C.; DIAS, E.S. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.1, p 70-72, 2005.

RAFAEL, J.A. Protocolos e técnicas de captura de Diptera. **Protocolos de Muestreo Del Proyecto**, PRIBES, 2002.

SHERLOCK, I.A.; GUITTON, N. Dermatozoonosis by *Culicoides bite* (DIPTERA, CERATOPOGONIDAE) in Salvador, State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 63 (único), p. 53-62, 1965.

SILVA, F.D.F.; FELLIPE-BAUER, M.L.; OKADA, Y. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) da vila de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.3, p. 123-128, 2010.

TRINDADE, R.L.; GORAYEB, I.S. Maruins (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), após a estação chuvosa, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 70-80, 2010.

WITTMANN, E.J.; BAYLIS, M. Climate Change: Effects on *Culicoides* – Transmitted Viruses and Implications for the UK. **The Veterinary Journal**, v.160, p. 107-117, 2000.

VAN DER RIJT, R.; VAN DER BOOM, R.; JONGEMA, Y.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.S. *Culicoides* species attracted to horses with an without insect hipersensivity. **Veterinary Journal**, v. 178, n. 1, p. 91-07, 2008.

VENTER, G.J.; LABUSCHAGNE, K.; HERMANIDES, K.G.; BOIKANYO, S.N.B; MAJATLADI, D.M.; MOREY, L. Comparison of the efficiency of five suction light traps

under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 299–307, 2009.

VERAS, R.S.; CASTELLÓN, E.G. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in Brazilian Amazon. V. Efficiency of traps and baits and vertical stratification in the Forest reserve Adolpho Ducke. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 145 – 152, 1998.