

CARLOS HENRIQUE DE AZEREDO LIMA

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300024567

Estomatite Vesicular Alagoas: estudo da transmissão entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaios (*Cavia porcellus*) através da água e desenvolvimento de um método de diagnóstico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

FMVZ - 022793



São Paulo

2003

ID 10304

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1231
FMVZ
e. 1
N.º TOMBO
022793
545W01.1343929

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1281 Azeredo Lima, Carlos Henrique de
FMVZ Estomatite vesicular alagoas: estudo da transmissão entre tilápias
nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaias
(*Cavia porcellus*) através da água e desenvolvimento de um método de
diagnóstico / Carlos Henrique de Azeredo Lima. -- São Paulo : C. H.
Azeredo Lima, 2003.
98 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Saúde Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada
às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.

1. Rhabdoviridae. 2. Estomatite vesicular animal. 3. Transmissão de
doenças. 4. Epidemiologia. 5. Tilápia. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa da ocorrência da Estomatite vesicular Alagoas (VSA) em peixes de região endêmica e estudo do ciclo epidemiológico em laboratório.", Protocolo nº 45/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/02/2002.

(We certify that the Research "Occurency of Vesicular Stomatitis (Alagoas - VSA) in fishes from endemic regions and research on epidemiologic cicle in laboratory conditions" protocol number 45/2002, under the responsability of Prof.Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2002 meeting.)

São Paulo, 27 de fevereiro de 2002


Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AZEREDO LIMA, Carlos Henrique de

Título: Estomatite Vesicular Alagoas: estudo da transmissão entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaios (*Cavia porcellus*) através da água e desenvolvimento de um método de diagnóstico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: 26/10/03

Banca Examinadora

Prof. Dr. SIDNEI MIYOSHI SAKAMOTO
Assinatura: Sidnei Miyoshi Sakamoto

Instituição: UNIFESP - EPM
Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Edniz Maristela P. Tucco
Assinatura: [Assinatura]

Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. RODRIGO MARTINS SOARES
Assinatura: [Assinatura]

Instituição: FMVZ-USP
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Guilherme Honório
Assinatura: [Assinatura]

Instituição: FMVZ-USP
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Jose Antonio Fez
Assinatura: [Assinatura]

Instituição: FMVZ-USP
Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

A Karen

a razão do meu retorno.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que estão sempre presentes sofrendo e torcendo por cada momento de nossas vidas.

A D. Lúcia e Sr Giussepe, pela constante presença e motivo de felicidade.

Aos meus orientadores Prof Jerez e Prof Cláudio, que serviram de modelo de conduta, integridade, dedicação, etc...Fica o desejo de um dia poder retribuir, ao menos uma pequena porcentagem, o que estes "pais adotivos" representaram em nossas vidas.

Ao Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos, pelo empenho na condução do curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelas sugestões e disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

A Profª. Drª. Solange Maria Gennari, pela amizade e disponibilização do Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelas valorosas sugestões a este trabalho.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Virologia, Paulão, Fábio, Pancho, Laura, Gianca, Paulo e outros que por lá passaram, ficam a saudade e eternizados todos os momentos alegres e os sérios esquecidos.

Ao Alexandre Abelardo Sanches, pelo apoio neste trabalho e o seu crescimento profissional que nos envaidece.

Aos colegas do curso de pós-graduação e Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Aos colegas do Laboratório de Viroses Veterinária, Bodão, Waldyr, Bernardo, Paulinha, a T1 e T2, Gabi, Ana, Solange, pelos momentos alegres e descontraídos.

A todos os docentes, funcionários do VPS e do IV e amigos que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do



***Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico***

Processo número 575106/99-9

RESUMO

AZEREDO-LIMA, C. H. Estomatite Vesicular Alagoas: estudo da transmissão entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaios (*Cavia porcellus*) através da água e desenvolvimento de um método de diagnóstico. [Vesicular Stomatitis Alagoas: study of the transmission between experimentally inoculated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) through water and the development of a diagnosis method]. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

Diante da necessidade de responder algumas indagações relacionadas a epidemiologia da Estomatite Vesicular, principalmente aquelas que dizem respeito a ocorrência de surtos em locais onde existem coleções d'água, foi desenvolvido um modelo de transmissão do VSA utilizando a água como via de transmissão, a tilápia nilótica, inoculada intraperitonealmente, como fonte de infecção e o cobaio como hospedeiro susceptível. O objetivo da utilização deste modelo biológico de transmissão do Vírus da Estomatite Vesicular foi de avaliar o papel desempenhado pelos peixes no ciclo epidemiológico, propor um modelo de ciclo epidemiológico do VSA, destacando o papel da água como via de transmissão e padronizar uma técnica de RT-PCR para a detecção do VSA, em amostra de tecidos. Através do modelo desenvolvido, fica demonstrado que estes peixes eliminaram partículas virais na água, decorridos 13 dias pós-inoculação e que esta última se caracteriza como via de transmissão, possibilitando a infecção dos hospedeiros susceptíveis (cobaios) através de inoculações experimentais em coxim plantar. A tilápia nilótica pode ser considerada como uma fonte de infecção, por ser capaz de eliminar um agente infeccioso no meio ambiente e através de uma via de transmissão este agente alcançou o hospedeiro susceptível; os peixes podem ser inseridos no ciclo

epidemiológico da Estomatite Vesicular como fonte de infecção, sendo capazes de eliminar na água partículas virais infectantes, destacando o papel da água como via de transmissão; fica padronizada uma técnica de RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente, útil para a detecção direta do Vírus da Estomatite Vesicular Alagoas e Indiana em amostras de tecidos.

Palavras-chaves: Rhabdoviridae. Estomatite vesicular animal. Transmissão de doenças. Epidemiologia. Tilápia.

ABSTRACT

ABSTRACT

AZEREDO-LIMA, C. H. **Vesicular Stomatitis Alagoas: study of the transmission between experimentally inoculated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) through water and the development of a diagnosis method.** [Estomatite Vesicular Alagoas: estudo da transmissão entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaias (*Cavia porcellus*) através da água e desenvolvimento de um método de diagnóstico]. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

A model of transmission of Vesicular Stomatitis was developed to Vesicular Stomatitis Alagoas (VSA) serotype employing water as a way of transmission, the Nile tilapia intraperitoneal inoculated as a source of infection and guinea pigs as susceptible hosts aiming to answer many questions concerning Vesicular Estomatitis epidemiology, as the risk of disease on farms with close relationship with riverine areas and the role of fishes in the epidemiological cycle of the disease. Furthermore, a RT-PCR assay was developed to detect VSA in tissue samples. According to the experimental transmission, fishes eliminated virus into the water after 13 days pos-infection and a model to VSA epidemiological cycle is proposed in which water was characterized as a way of transmission, carrying the virus to the susceptible host through experimental inoculation and the Nile tilapia should be thought as a source of infection, once it was able to eliminate the infective agent into the environment. A useful tool to the diagnosis of both Indiana and Alagoas serotypes was developed.

Key words: Rhabdoviridae. Vesicular Stomatitis. Disease Transmission. Epidemiology. Tilapia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

apud= citado por

%= por cento

μg = micrograma

μl = microlitro

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

CEDAE = Companhia Estadual de Água e Esgoto, Rio de Janeiro

CO_2 = gás carbônico

DEPC = dietil-piro-carbonato

DNAc = ácido desoxirribonucléico complementar

et al.= e colaboradores

ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay

g = aceleração da gravidade terrestre ($9,8 \text{ m/s}^2$)

M= molar

mA= miliamper

MEM=minimum essential medium

mg=miligrama

ml= mililitro

mm= milímetro

mM= milimolar

pM= picomolar

N= normal

nm= nanômetro

p/v= peso/volume

pH= concentração de hidrogênio iônico

q.s.p.= quantidade suficiente para

RNA= ácido ribonucléico

SDS= dodecilsulfato de sódio

TEMED= tetrametiletilenodiamina

TRIS= hidroximetil-aminometano

v/v= volume/volume

VS= Estomatite vesicular

VSV= Vírus da Estomatite Vesicular

VSA= Vírus da Estomatite Vesicular Alagoas

VSV-Ind= Vírus da Estomatite Vesicular Indiana

VSV-NJ= Vírus da Estomatite Vesicular New Jersey

TCID₅₀= Tissue culture infectious dose

Observação: Em função do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>) pertencente à família <i>Cichidea</i>	52
Figura 2 - Resumo esquemático do modelo epidemiológico desenvolvido para o estudo da transmissão do VSA, entre tilápias nilóticas (<i>Oreochromis niloticus</i>) experimentalmente inoculadas e cobaios (<i>Cavia porcellus</i>) através da água – São Paulo – 2003.....	57
Figura 3 - Administração oral de água, dos aquários com peixes inoculados com VSA, para os cobaios. Observar marcação de identificação na orelha dos animais - São Paulo - 2003.....	59
Figura 4 - Resumo esquemático e resultados obtidos a partir do modelo epidemiológico desenvolvido para o estudo da transmissão do VSA, entre tilápias nilóticas (<i>Oreochromis niloticus</i>) experimentalmente inoculadas e cobaios (<i>Cavia porcellus</i>) através da água – São Paulo – 2003.....	70
Figura 5 - Lesões descamativas, no epitélio plantar do membro anterior direito em um cobaio, observadas a partir do sétimo dia após a administração da água dos aquários dos peixes inoculados com o VS Alagoas - São Paulo – 2003.....	71
Figura 6 - Resultado do gradiente de temperatura para o par de primers CARPS/ CARPAS para os vírus VSV-Ind e VSA - São Paulo – 2003.....	75
Figura 7 - Limiar de detecção para o par de primers VSIPS/VSIPA para o VSV-Ind em tecido de peixe - São Paulo – 2003.....	75
Figura 8 - Resultado da amplificação de um fragmento do gene da polimerase utilizando o par de primers CARPS/CARPAS para as diversas amostras de VSA - São Paulo – 2003.....	76
Figura 9 - Representação esquemática do ciclo de multicasualidades proposto para Vírus da Estomatite Vesicular apresentando as diversas vias de transmissão propostas por vários autores - São Paulo – 2003.....	84

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 CLASSIFICAÇÃO	25
2.2 MORFOLOGIA	26
2.3 GENOMA	26
2.4 RELAÇÃO ENTRE OS SOROTIPOS	27
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	28
2.6 EPIDEMIOLOGIA	29
2.6.1 Teorias que envolvem a transmissão	32
2.6.2 Características que afetam a transmissão.....	37
2.6.3 Período de ocorrência.....	41
2.6.4 Soroprevalência	43
2.6.5 Animais silvestres	44
2.6.6 Distribuição geográfica	46
2.6.7 Ocorrência no homem	47
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 VÍRUS	51
4.2 CÉLULAS	52
4.3 TILÁPIAS	52
4.4 COBAIAS	53
4.5 ÁGUA	53
4.6 CULTIVO CELULAR	54
4.7 PREPARO DA SUSPENSÃO VIRAL	55
4.7.1 Titulação da suspensão viral	55
4.8 INOCULAÇÃO EM PEIXES.....	56
4.8.1 Inoculação experimental em tilápias	57
4.8.2 Transmissão para os cobaios	58

4.9 PROVA DE SORONEUTRALIZAÇÃO	60
4.10 ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CULTURA CELULAR	60
4.11 HISTOPATOLOGIA	62
4.1 DETECÇÃO DO VSV PELA TÉCNICA DE REACÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA COM TRANSCRIPTASE -REVERSA (RT-PCR)	62
4.12.1 Extração do RNA viral	62
4.12.2 Transcrição reversa	64
4.12.3 Síntese de c-DNA (RT)	66
4.12.4 Amplificação pela reacção em cadeia pela polimerase (PCR)	67
4.12.5 Detecção do produto amplificado	67
5 RESULTADOS	69
5.1 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	71
5.2 HISTOPATOLOGIA	72
5.3 ISOLAMENTO	72
5.4 SORONEUTRALIZAÇÃO DOS COBAIOS	73
5.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR	74
5.5.1 Padronização da técnica de reacção da polimerase em cadeia com transcriptase - reversa (RT-PCR) para a detecção do VSA	74
5.5.2 Detecção do VSA em tecido de cobaio pela técnica de reacção da polimerase em cadeia com transcriptase -reversa (RT-PCR)	76
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	78
8 REFERÊNCIAS	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho resultou da necessidade de preencher lacunas e esclarecer alguns aspectos obscuros da epidemiologia do VSV, considerando a freqüente ocorrência de surtos em locais onde existem coleções naturais de água.

Neste sentido, realizou-se uma revisão da literatura com ênfase na epizootiologia da doença, considerando-se os fatores predisponentes e inibitórios para o desenvolvimento de um surto. Mediante um modelo de transmissão, através de inoculações experimentais, investigou-se o possível envolvimento de peixes desempenhando o papel de fonte de infecção do vírus da Estomatite Vesicular Alagoas, utilizando-se a água como via de transmissão aos animais susceptíveis.

Além disso, foi desenvolvido um método diagnóstico utilizando-se a reação de RT-PCR, o qual contribuirá para a avaliação da ocorrência de VSV em animais de produção, passo este fundamental no delineamento de medidas profiláticas relativas à doença.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura abordou a classificação, morfologia, constituição genômica do VSV, relação entre os sorotipos, manifestações clínicas e epidemiologia, com ênfase em temas relacionados à distribuição geográfica, animais silvestres, soroprevalência, período de ocorrência e transmissão.

2.1 CLASSIFICAÇÃO

O VSV pertence ao gênero *Vesiculovirus*, da família *Rhabdoviridae*, da ordem *Mononegavirales*. Esta família é dividida em dois gêneros, os *Vesiculovirus* e os *Lyssavirus*. Os vírus da família *Rhabdoviridae* são conhecidos por infectarem diversos vertebrados, invertebrados e plantas (BISHOP, 1979; MURPHY et al., 1995).

O gênero *Vesiculovirus* é dividido em dois grandes grupos antigenicamente distintos: o grupo da Estomatite Vesicular New Jersey (VSV-NJ), com um único representante, e o grupo da Estomatite Vesicular Indiana sendo (VSV-Ind) composto pelos vírus Estomatite Vesicular Indiana, Cocal e Estomatite Vesicular Alagoas (VSA) (MURPHY, et al., 1995; NOZAWA; ANDRADE, 1978; RODRIGUEZ, et al., 2000).

2.2 MORFOLOGIA

Todos os membros do grupo do VSV são morfologicamente idênticos e possuem formato semelhante a de um projétil, possuem comprimento em torno de 175 nm e 65 nm de largura, com nucleocapsídeo helicoidal e presença de peplômeros medindo 10 nm de comprimento (BISHOP, 1979; COHEN.; LENOIR, 1974).

2.3 GENOMA

O genoma do vírus possui uma única fita de RNA de polaridade negativa, com aproximadamente 11000 bases, que codifica cinco proteínas: o nucleocapsídeo (N), fosforoproteína (P), matrix (M), glicoproteína (G) e a polimerase (L) (SCHUBERT et al., 1982; SCHUBERT; HARMISON; MEIER, 1984). A seqüência de nucleotídeos das proteínas P e G tem sido utilizada para análises filogenéticas (BILSEL et al., 1990; BILSEL; NICHOL, 1990).

O genoma é transcrito por uma enzima denominada RNA-polimerase RNA-dependente e é promovida por uma seqüência de RNA líder não sistrônicos, de 47 nucleotídeos, gerando mRNAs *capped*. O RNA viral é traduzido pelo maquinário celular para produzir as cinco proteínas estruturais supracitadas - N, P, M, G e L

(SPIROPOULOU; NICHOL, 1993). No interior da célula do hospedeiro, o vírus a partir da fita de RNA negativa produz uma nova cópia no sentido positivo da fita de RNA, a qual serve como alvo para a síntese do genoma de sentido negativo (LUK et al., 1987). A estrutura do nucleocapsídeo contém duas outras proteínas, a fosforoproteína (P) e a polimerase ou grande proteína (L) (BANERJEE, 1987). O gene da polimerase (L) é essencial para a replicação e raramente está ausente em partículas defectivas. O gene da nucleoproteína (N) produzido durante a replicação possui regiões subgenômicas bastante abundantes durante a transcrição do RNA. A glicoproteína (G) forma os peplômeros no envelope viral, o qual interage com o receptor viral presente na superfície da célula susceptível e fornece o acesso de reação com os anticorpos neutralizantes. A proteína da matriz (M) se associa intimamente ao conjunto da superfície do envoltório, ligando a proteína G à estrutura do nucleocapsídeo durante o processo de montagem e brotamento (BARRERA; LETCHWORTH, 1996; BRICKER, et al., 1987; MANCARELLA; LENARD, 1981).

2.4 RELAÇÃO ENTRE OS SOROTIPOS

Nozawa e Andrade (1978) realizaram um estudo no sentido de verificar o comportamento sorológico dos VSV (New Jersey, Indiana, Cocal e Alagoas) e observaram que não há reação cruzada entre os VSV no teste de soroneutralização. Os resultados obtidos sugerem entretanto, a existência de um subgrupo, dentro do grupo VSV, constituído pelas amostras Indiana, Cocal e Alagoas.

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A manifestação clínica em eqüinos, bovinos e suínos é caracterizada por vesículas extensas e lesões erosivas, freqüentemente acompanhadas por acometimentos das regiões da mucosa oral, superfície ou margem da língua, lábios, focinho, banda coronária, espaço interdigital, tetas, prepúcio e vulvas. Alguns animais podem apresentar ainda conjuntivite e alterações na mucosa nasal, bem como no esôfago e no rúmen. As lesões iniciam-se como pequenas pápulas que aumentam de tamanho e coalescem, evoluindo para vesículas. Estas por sua vez ulceram deixando áreas desnudas da mucosa com fragmento de epitélio aderido à borda. As vesículas contêm líquido claro a citrino (ANDRADE, 1974; ANDRADE et al., 1980; COTTON, 1926; STRORZZI; RAMOS-SACO, 1953).

A superfície das vesículas é facilmente destacável durante o exame clínico, mastigação ou atrito contra superfícies, deixando assim, extravasar o conteúdo líquido rico em material infectante (SANTOS, 1986; THOMSON, 1990).

As lesões localizam-se principalmente nas mucosas, iniciando-se por um edema intracelular, resultando em uma degeneração hidrópica vacuolar. Esta degeneração ocorre no *stratum spinosum*. As células acometidas por esta degeneração apresentam-se tumefeitas e citoplasma aumentado de tamanho, com conteúdo eosinofílico e núcleo picnótico. Associado as alterações celulares ocorre a formação de infiltrado leucocitário perivascular, podendo, também ser observada hemorragia. Após a lise celular, o líquido extravasado acumula-se nos espaços entre as células produzindo o edema intercelular. O vírus se replica abaixo do

estrato granuloso, produzindo um acúmulo de líquido (SANTOS, 1986; THOMSON, 1990).

O líquido fica retido abaixo dos estratos granuloso, lúcido e córneo, utilizando-os como se fosse uma abóbada para a vesícula. As uniões dessas áreas de lesões formam as vesículas que, quando se rompem, dão origem às úlceras. Posteriormente, estas áreas, sofrerem um revestimento fibrinopurulento superficialmente e a proliferação de tecido granuloso na base (SANTOS, 1986; THOMSON, 1990).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

Johnson, Tesh e Peralta (1969) iniciaram o trabalho afirmando que estariam longe de desvendar como o VSV é transmitido aos animais domésticos e como o agente sobrevive entre as epizootias. Em 1981, Andrade et al. se ressentiam da falta de literatura nacional e de atividade de pesquisa com relação ao caráter zoonótico, e estudos a respeito dos possíveis hospedeiros do VSA.

A ecologia do VSV é pouco conhecida e apresenta muitos aspectos obscuros a serem elucidados com relação ao ciclo básico da infecção. São numerosas as interrogações sobre onde e como o vírus se mantém na natureza, como se transmite de um animal para outro e como este se introduz em rebanhos livres desta enfermidade (ACHA; SZYFRES, 1986).

Em um estudo prospectivo, tipo caso controle, que objetivava de descobrir os riscos ecológicos relacionado aos casos clínicos de VS, Van-Leeuwen, Rodriguez e

Waltner-Toews (1995) relataram que muitas características da epidemiologia ainda permaneciam incertas, tais como: porque os animais de algumas propriedades eram afetados e de outras propriedades não? Quais os fatores que estariam contribuindo para a manutenção do vírus entre os períodos de surtos?

O mecanismo pelo qual o VSV persiste na natureza ainda é desconhecido. Através das seqüências gênicas de VSV isolados nos últimos 40 anos demonstrou-se que o VSV-NJ pode permanecer estável em um foco enzoótico, onde este proporciona uma lenta alteração genotípica e um provável afastamento da pressão seletiva do sistema imunológico dos mamíferos. Somente seis aminoácidos diferenciam a proteína G de amostras isoladas em 1952 das, de um foco enzoótico de VSV-NJ na Geórgia, EUA, de 1983 (BARRERA; LETCHWORTH 1996; NICHOL; ROWE; FITCH, 1989).

O ciclo do VSV existem evidências de que insetos carregam o vírus em áreas endêmicas e são capazes de infectar animais domésticos e de laboratório e, possivelmente, humanos (RODRIGUEZ, 2002).

Associando os dados epidemiológicos e a distribuição geográfica dos surtos dos últimos 30 anos ocorridos na América do Norte e Central, pode ser observado que cada ciclo de atividade do VSV estava associado com uma linhagem distinta de vírus. A pequena quantidade de VSV-Ind disponível para a análise reflete o fato de que este sorotipo causa minoria dos surtos. (RODRIGUEZ; FITCH; NICHOL, 1996).

A topologia da árvores filogenéticas para os dois sorotipos demonstram uma forte associação entre a origem e a posição. Todos os vírus do México e Estados Unidos estão agrupados em uma chave separada, em que cada sorotipo demonstra que estes vírus compartilham um próximo ancestral comum. Todavia, distintas linhagens genéticas têm sido associadas com diferentes zonas ecológicas

enzoóticas da Costa Rica e Panamá, sugerindo uma adaptação do vírus às condições específicas dessas áreas (RODRIGUEZ; FITCH; NICHOL, 1996).

As observações de que a VS aparentemente persiste no Oeste dos Estados Unidos por cerca de um a dois anos, permite inferir que a VS seja enzoótica nesta área. No Oeste dos Estados Unidos, a VS ocorre de forma esporádica, observada por prevalência de anticorpos em rebanhos e humanos, sendo baixa em animais selvagens. O isolamento viral a partir de vetores é restrito ao período de ocorrência de sua forma clínica de VS (REIF; WEBB; MONATH, 1987; WALTON; WEBB; FRANCOY, 1983; WEBB et al., 1987a,b).

Sabe-se que as condições ecológicas, mais que origem geográfica ou seleção imunológica, parecem ser os principais fatores que influenciam na evolução do VSV em regiões endêmicas. Análises filogenéticas de amostras VSV-NJ originárias de diferentes áreas da América Central demonstraram que vírus de mesma linhagem foram oriundos de áreas com características ecológicas semelhantes (RODRIGUES; FITCH; NICHOL, 1996).

Os padrões de evolução do VSV sob condições naturais sugerem, entre outras características, uma associação de linhagens genéticas com determinadas regiões geográficas, podendo-se dividir em dois grandes grupos: um para o México e Estados Unidos e outro para a América Central. Em regiões endêmicas, as mesmas linhagens genéticas foram mantidas por longos períodos de tempo, mas continuam desconhecidas as forças que dirigem a evolução do VSV (RODRIGUEZ, 2002).

Na Colômbia, a VS tem sido diagnosticada nos últimos anos com maior frequência do que a febre aftosa. Indicando que seu impacto econômico pode ser maior, uma vez que a febre aftosa está sob controle oficial no país (VILLALOBOS; BARRERA; VILLAMIL, 2001).

2.6.1 Teorias que envolvem a transmissão

Desde os primeiros surtos da VS, diversas teorias de transmissão vêm sendo propostas e amplamente discutidas e questionadas quanto às suas validades. Dentre elas, foi proposto que o VSV-Ind fosse considerado basicamente um vírus de planta com a presença de dois envelopes e, quando os flebótomos, ou outros insetos, infectavam-se a partir da planta, o vírus perderia o segundo envelope e se tornaria infeccioso para os vertebrados. (JOHNSON; TESH; PERALTA, 1969). Existe a teoria da transmissão por artrópodes teve como base em três aspectos que apontariam a possível transmissão por vetor: a ocorrência sazonal, as limitações ecológicas e à velocidade e o modo de disseminação (HANSON, 1952).

O VSV foi isolado de diversos dípteros, (*Culicoides variipennis*, *Simuliidae* spp., *Chloropidae* spp., *Anthomyiidae* spp., *Musca domestica* e *M. autumnalis*), entretanto, ainda não foi identificado se estes insetos podem desempenhar o papel de vetor biológico e contribuir para a disseminação da doença (WALTON; WEBB; FRANCY, 1983).

Durante o surto de VS ocorrido no oeste dos EUA nos anos de 1982 e 1983, Kramer et al. (1990) analisaram 120422 amostras de insetos e isolaram 106 amostras positivas, sendo quatro relacionadas com o VSV-NJ.

Corn et al. (1990), descreveram que o período onde foi isolado o vírus da VSV-NJ de *Lutzomyia shannoni* precedeu a detecção de lesões vesiculares, mas correspondeu ao período de soroconversão em porcos selvagens da Ilha de

Ossabaw, Geórgia. Foi também relatada a replicação e a transmissão da Estomatite Vesicular New Jersey por *Lutzomyia shannoni*. Foi demonstrado, em condições de laboratório, que a *L. shannoni*, pode se comportar como vetor biológico. Além disso, o isolamento VSV-NJ a partir de um macho dessa mesma espécie na Ilha de Ossabaw é bastante sugestivo de que pode ocorrer a manutenção do vírus por transmissão vertical (COMER et al., 1990; SCHIMIDTMANN et al., 1999).

Cupp et al. (1992), infectaram moscas negras (*Simulium vittatum*) pelas vias intraperitoneal e oral, recuperando o vírus na saliva entre 9 e 10 dias pós inoculação. Com esta evidência experimental, sugeriram que a mosca negra pode participar na epizootiologia da transmissão do VSV-NJ, sendo este o primeiro exemplo de transmissão biológica de um arbovírus por um membro da família *Simuliidae*.

Segundo Schimidtmann et al. (1999), outras três características epizootiológicas suportam a teoria da transmissão por insetos: os surtos são sazonais movendo-se do Sul para o Norte durante os meses do verão e terminando no inverno (EUA), coincidindo com os meses quentes que promovem maior atividade de insetos; os animais pastando próximos aos rios são geralmente os que apresentam maior risco de exposição: o VSV-NJ tem sido isolado de diferentes tipos de dípteros, incluindo espécies conhecidamente vetores de outros arbovírus.

Considerar-se também a transmissão por fatores multivariados estudados por Stallknecht (2000) na Ilha de Ossabaw, Geórgia, onde foi sugerido que ocorrência entre os porcos selvagens provavelmente envolva diferentes formas. Foi verificado, também, nestes estudos que a infecção pode ocorrer nos animais por: contato, vetores mecânicos, inoculações intranasal e intradérmica. Estas últimas formas podem também representar as mais importantes vias de transmissão depois que o

vírus foi introduzido na população de animais domésticos (STALLKNECHT et al., 2001).

Dentre as vias descritas, a transmissão por contato de VSV-NJ não resulta em um longo período de manutenção viral nas populações de animais domésticos. Contudo, isso pode representar a maior via de transmissão depois que o vírus foi introduzido no rebanho. Esta transmissão, especialmente nos casos clínicos, também, pode servir como amplificador do vírus, favorecendo a disseminação por vetores mecânicos. Isto pode representar uma importante situação na qual uma subsequente transmissão viral por via de co-alimentação para uma população de insetos (STALLKNECHT et al., 2001).

A utilização de diversas vias de transmissão vem sendo estudada por diferentes pesquisadores no intuito de desvendar a epidemiologia da VS. Baseado na distribuição da ocorrência e fatores restritivos da Estomatite Vesicular e utilizando-se a água como uma das principais vias de transmissão e peixes como um possível hospedeiro susceptível, Azeredo-Lima et al. (1998) realizou um estudo através da inoculação intraperitoneal e por imersão em suspensão viral de VSA. Os resultados demonstraram a presença de alterações anatomopatológicas no tubo digestivo da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) e que esta ainda, eliminava partículas na água, capazes de produzirem infecção nos peixes

O envolvimento da água já havia sido observado quando a enfermidade, em algumas ocasiões, é transmitida a cavalos sadios que utilizam o mesmo cocho de água dos enfermos (THEILER,¹ 1901 apud HANSON, 1952, p. 181).

A epidemiologia do VSV tem sido difícil de entender, e a transmissão não sistêmica pode ser importante no ciclo natural do vírus. Considera-se transmissão

¹ THEILER, S. Eine contgiöse Stomatitis de Pferds in Süd-Africa. *Deut. Iiterärztl. Wochsch.*, v. 9, p. 131 – 132, 1991

não sistêmica quando um patógeno é transmitido entre infectados e não infectados sem que o hospedeiro vertebrado apresente viremia. Este aspecto poderia explicar a transmissão em sistema onde é difícil de identificar o hospedeiro (LORD; TABACHNICK, 2002).

Observando o espaço de tempo decorrido entre o término dos sinais clínicos até o isolamento do vírus, diversas teorias de persistência têm sido levantadas. O VSV foi isolado de uma vaca, 21 dias após a manifestação dos sinais clínicos, indicando que o VSV esteve em fase de eclipse por um longo período após a inoculação (THURMOND et al., 1987). Através da utilização de técnicas moleculares de diagnóstico em hamsters experimentalmente inoculados, foi detectada a presença de RNA genômico no cérebro, cerebelo, fígado, vesícula biliar, rins e pulmões dois meses após a inoculação, dez meses após inoculação no cérebro e cerebelo e, doze meses após a inoculação no cérebro e medula (BARRERA; LETCHWORTH, 1996).

Os animais podem estar sendo constantemente estimulados antígenicamente pela livre circulação do VSV na natureza, através de artrópodes, mamíferos reservatórios e infecção persistente (RODRIGUEZ et al., 1990). Em um estudo transecional realizado na Costa Rica, foi observada a possibilidade da existência de dois focos endêmicos ativos em diferentes áreas geográficas e climatológicas e, podendo com isto, existir dois modos diferentes de ciclo transmissão (ATWILL et al., 1993).

O VSV pode estar sendo mantido em nichos ecológicos estáveis nas Américas. Anualmente surtos de VS ocorrem dentro destes nichos e infectam uma grande percentagem de espécies susceptíveis (ATWILL et al., 1993; LETCHWORTH et al., 1999).

Tem sido sugerido que o VSV pode ser mantido no Sudoeste dos Estados Unidos, em um ciclo desconhecido, em animais selvagens ou como infecção assintomática persistente em animais domésticos. Essas evidências resultam de levantamentos sorológicos que detectaram infecções com a ausência de manifestações clínicas em animais domésticos ou selvagens durante anos em que não houve a ocorrência de animais com sintomas clinicamente detectáveis da VS (MUNFORD et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2000; WEBB et al., 1987b)

Foi proposto a existência de dois cenários para a transmissão do vírus. Em um deles, o VSV-NJ seria mantido entre os animais silvestres como um ciclo enzoótico com periódicos surtos mediados por insetos vetores, que amplificariam o vírus e introduziriam nas espécies domésticas. No outro cenário, o vírus estivesse sendo introduzido periodicamente a partir do Sudoeste dos Estados Unidos, ostensivamente vindo dos rebanhos mexicanos, seguidos por transmissão biológica por insetos e mecânica (SCHIMIDTMANN et al., 1999).

Os dados filogenéticos, apresentados por Rodriguez et al., (2000), suportam dois diferentes padrões de ocorrência de VS, cada um associado a uma linhagem genética distinta. Fundamentados nestes resultados os autores concluíram que, a VS ocorre esporadicamente e não possui um ciclo estável no Oeste dos Estados Unidos ou no Norte do México. Estudos do ciclo natural do VSV em áreas enzoóticas do México são necessárias para obter uma melhor compreensão do mecanismo e fatores que podem determinar a ressurgência desses vírus nos Estados Unidos (RODRIGUEZ et al., (2000). Ressaltam ainda que os animais domésticos, tais como, bovinos e suínos são hospedeiros finais, dos quais não retornariam o vírus para o seu ciclo natural. Esta observação foi sugerida devido ao fato de não ter sido demonstrada viremia em espécies domésticas, de se manterem-se estáveis em

áreas endêmicas naturais e de não sofrerem forte pressão imunológica seletiva (RODRIGUEZ, 2002).

2.6.2 Características que afetam a transmissão

Juntamente com as primeiras descrições da ocorrência de surtos de VS no rebanho, diversas características de sua aparição foram amplamente estudadas objetivando o esclarecimento de seu ciclo epidemiológico de modo que seja possível um controle efetivo na disseminação dessa enfermidade. Dentre as características descritas pelos diversos autores, podemos destacar os seguintes pontos:

- Com base nas peculiaridades dos surtos de VS foram estabelecidas relações entre a doença e certas estações do ano. Nos Estados Unidos, a enfermidade está limitada aos meses de julho a novembro quando começam as primeiras neves (HEINY, 1945).
- Observou-se também que existe uma relação entre zonas climáticas e a frequência de ocorrência da doença. A disseminação da enfermidade desloca-se por certos vales e é muito rápida. No Colorado, a enfermidade repetidamente ocorre ao longo de dois cursos de água (HEINY, 1945).

Os pastos irrigados, rios e lagos são normalmente as regiões epizoóticas e a ausência desses fatores na região é limitante para a disseminação da VS (HANSON, 1952). Foi verificado que a evolução natural do VSV predominantemente resulta da seleção do vírus pelos fatores ecológicos e não que um simples *drift* genético em áreas geograficamente separadas (RODRIGUEZ; FITCH; NICHOL, 1996). É

observado que a VS segue cursos naturais de água, disseminando-se nas propriedades ribeirinhas e posteriormente nas mais afastadas, infectando rebanhos ao longo dos cursos d'água. Os surtos normalmente ocorrem em pastos irrigados e locais em que presença de rios e lagos são comuns, em oposição à ambientes em que existe a predominância de planícies abertas e áreas áridas (HANSON, 1952).

Rodriguez, Fitch e Nichol (1996) apontaram a evidência de que, principalmente, os fatores ecológicos estão presentes na evolução do VSV em áreas endêmicas, mais do que as pressões imunológicas. Os fatores ecológicos aparecem como os mais importantes na identificação de quais propriedades estariam mais vulneráveis a serem acometidas pela VS clínica, dentre eles destacando-se a maior percentagem de uma determinada propriedade dentro de uma mata e a ocorrência de Lutizomia podendo estes fatores apresentarem-se isoladamente ou em conjunto para a manifestação clínica da VS (VAN-LEEUEWEN; RODRIGUEZ; WALTNER-TOEWS, 1995).

Diferentemente de outros estudos que sugerem a exposição ao pasto ou a falta de abrigo como fatores de risco para a ocorrência de VS, a associação com pasto ou ao tipo de abrigo não foi detectada no ano de 1995, nem tampouco no *status* sorológico de 1996. Este resultado pode ter sido atribuído à falta de um número suficiente de propriedades controles incluídas no estudo (MUNFORD et al., 1998).

Em uma análise dos fatores de risco identificados para a ocorrência da manifestação clínica da VS, foi observado que alguns destes fatores considerados importantes para outras enfermidades não foram considerados significativos. Contudo, a manutenção de animais a uma distância menor ou igual a quatrocentos metros de uma fonte de água corrente, o acesso ao pasto, a falta de abrigo e o

aumento na população de insetos aumentam significativamente o risco do desenvolvimento da doença (HURD; MCCLUSKEY; MUMFORD, 1999).

Utilizando método de estudo epidemiológico, o estudo de caso controle realizado por McCLUSKEY et al., (2002) observaram que o grupo de animais com maior risco de possuir títulos de anticorpos para VSV era aquele que, por premissa, possuía acesso ao pasto, no qual o proprietário relatava aumento na população de insetos e onde os cavalos eram estabulados a menos de quatrocentos metros de uma fonte de água corrente.

Os locais de reprodução de artrópodes vetores parecem ser mais importantes na determinação de quais propriedades poderão apresentar animais com VS clínica do que a idade, lactação e condições do epitélio da teta. Estes últimos fatores estão mais associados à determinação de qual indivíduo é mais susceptível (VAN-LEEUVEN; RODRIGUEZ; WALTNER-TOEW, 1995). O VSA, de forma semelhante aos outros VSV, apresenta também restrições geográficas (LÓPEZ INZAURRALDE et al., 1997).

O desenvolvimento do modelo epidemiológico de paisagem relativo às características das regiões onde ocorreram os surtos em 1995 (Novo México, Colorado, Wyoming, Utah Texas e Arizona) nos EUA, com 329 casos e a utilização de dados baseados nas características de vegetação, hidrografia e topografia demonstraram que, para a região do Rio Grande, 50,9% dos casos ocorreram próximos a rios ou córregos, com distância média de 200 metros da fonte de água; para a região de Cortez, 80,9% dos casos, tinham distância média de 271 metros e para a região do Grand Junction, 60,6% dos casos, a distância média foi de 289 metros (MARONEY; FREIER, 1995).

Estudos moleculares de filogenia, também, apontam uma grande relação do VSV com as características ecológicas semelhantes de regiões distintas. A distribuição aleatória das seqüências das glicoproteínas entre as diversas amostras de VSV-NJ isoladas podem sugerir que a pressão evolucionária claramente é um fator de pequeno peso na natureza. Um dos padrões evolutivos observados é a dispersão e adaptação a uma série de sucessivos nichos ecológicos (NICHOL; ROWE; FITCH, 1993), todavia isto não sugere que este processo esteja ocorrendo em hospedeiros vertebrados ou insetos vetores (BARRERA; LETCHWORTH, 1996).

Comparando-se os títulos de anticorpos para VSV-Ind e VSV-NJ, de uma mesma espécie animal, procedentes de áreas endêmicas, os títulos para VSV-Ind estariam relacionados com fatores ambientais presentes no habitat natural endêmico, provavelmente, artrópodes vetores. Contudo, para o VSV-NJ estariam mais relacionados os fatores inerentes aos hospedeiros, provavelmente justificando a persistência do genoma viral (VILLALOBOS et al., 2001).

Atwill et al. (1993) avaliaram o envolvimento do ambiente no ciclo do VSV e distribuíram grupos de bovinos por diferentes altitudes. Através deste experimento sugeriram que, pelo menos, dois ciclos de transmissão podem ocorrer para o vírus VSV-NJ. Um para alta e outro para baixa altitude. Essas regiões podem indicar presença de diferentes artrópodes vetores ou reservatórios naturais. Nenhum fator foi associado ao sorotipo Indiana, provavelmente este possui um ciclo diferente do VSV-NJ.

Utilizando a técnica de RT-PCR, em bovinos naturalmente infectados, foi possível amplificar um fragmento do genoma, do gene L, decorridos nove meses após a infecção (VILLALOBOS et al., 2001). A detecção da presença de RNA genômico no cérebro e medula doze meses após a inoculação dos hamsters

(BARRERA; LETCHWORTH, 1996) e o isolamento do vírus de 21 dias após a manifestação clínica indicam que o VSV pode permanecer em eclipse por um longo período após a inoculação (THURMOND et al., 1987).

2.6.3 Período de ocorrência

Antes mesmo do isolamento e identificação do agente como um vírus responsável por produzir a Estomatite Vesicular em animais domésticos, Mohler², em 1904 (apud HANSON, 1952, p. 182), observou que esta enfermidade desaparecia de um local, em determinado período e reaparecia posteriormente com diferentes intervalos de tempo. Isto poderia sugerir uma associação a certas condições climáticas uma vez que seriam essenciais para a propagação desse “fungo”. Oficiais da British Remount Depot em Newport, Virginia publicaram suas experiências em 1916, onde a doença apareceu no final do verão e quatro meses depois desapareceu (HANSON, 1952).

Os dados entomológicos e epizoóticos foram revisados com base no potencial de transmissão da VSV, por insetos, incluindo os dados de campo. A epidemia de 1995, semelhante a outros surtos no Oeste Americano, ilustrou a sazonalidade da exposição ao vírus, aumentando durante a estação quente e diminuindo com a chegada do frio. A atividade viral é observada através da disseminação a partir do Sul para o Norte seguindo o curso de rios do Sudoeste e das Montanhas Rochosas dos Estados Unidos (SCHIMIDTMANN et al., 1997)

² MOHLER, J. R. Mycotic stomatitis cattle. US Bureau Animal Indiana Circ, n. 51, 1904.

Estudos realizados na Ilha de Ossabaw têm documentado anualmente a atividade viral na primavera e verão entre os porcos selvagens (SCHIMIDTMANN, 1997; STALLKNECHT, 1986).

Em áreas tropicais e subtropicais a VS clínica é comum no final da estação chuvosa e início da estação seca (RODRIGUEZ et al., 1990). Na Colômbia, o número de surtos em gado bovino normalmente ocorre com maior freqüência em fevereiro e agosto, durante a transição da estação chuvosa com a seca (LETCHWORTH, 1999; ORREGO et al., 1992). O VSA mantém uma presença ativa desde que foi isolado até o presente momento, sendo diagnosticado praticamente todos os anos, afetando eqüinos, bovinos, suínos e caprinos. Em muitas situações acometem somente bovinos eliminando assim as possibilidades de um diagnóstico clínico (LÓPEZ INZAURRALDE et al., 1997).

A freqüência de ocorrência de casos clínicos é sazonal, como na maioria dos casos ocorridos durante o início da estação seca (novembro a janeiro) , estando de acordo com as observações realizadas por Rodriguez et al. (1990) nos últimos 15 anos na Costa Rica.

Os elevados títulos de anticorpos podem indicar uma grande exposição aos vetores ou ao vírus propriamente dito. Todos os casos clínicos ocorridos no período do estudo de Van-Leeuwen, Rodriguez e Waltner-Toews (1995), se deram na estação seca, combinado com a típica época seca de elevação da população de artrópodes vetores . Alguns roedores possuem anticorpos para o VSV-Ind e VSV-NJ e sugere que a atividade viral ocorra durante o período de seca. (JIMENEZ et al., 2000).

2.6.4 Soroprevalência

Em bovinos, os anticorpos neutralizantes permanecem por até 8 meses (RODRIGUEZ et al., 1990) enquanto nos eqüinos podem permanecer por até um ano sem que ocorra variação. Evidências experimentais em ratos demonstraram que a presença de anticorpos neutralizantes não são suficientes para prevenir as manifestações clínicas da VS (LETCHWORTH et al., 1999).

Levantamentos sorológicos detectaram infecções assintomáticas em animais domésticos e selvagens em anos sem a ocorrência de forma clínica da VS (MUNFORD et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2000; WEBB et al., 1987b).

Cerca de 80% por cento dos cavalos da Geórgia (GE), EUA, e aproximadamente 50% dos veados de cauda branca na ilha de Ossabaw, GE, possuem anticorpos neutralizantes para VSV e de 12 a 60% dos porcos selvagens da mesma localidade soroconvertem a cada ano (LETCHWORTH, 1999; STALLKNECHT et al., 1986). Foi encontrada soroprevalência para VSV-NJ em três rebanhos com títulos elevados durante 20 meses. Enquanto para VSV-Ind o título foi relativamente baixo. Este levantamento demonstra que a flutuação de anticorpos foi semelhante em bovinos naturalmente infectados em áreas enzoóticas para VSV-NJ (RODRIGUEZ et al., 1990).

2.6.5 Animais silvestres

Nas áreas tropicais endêmicas encontra-se um grande número de animais silvestres reagindo positivamente a pesquisas sorológicas, conquanto não tenha sido demonstrado se estes animais são reservatórios naturais ou se entraram no ciclo da doença acidentalmente. A alta porcentagem de animais silvestres reativos, sem o envolvimento de animais domésticos, indica que este vírus pode circular livremente dentro dessa população (ZULUAGA; YUILL, 1979).

No Brasil, em um levantamento realizado em animais domésticos e silvestres através da técnica de fixação de complemento, utilizada em 112 soros de eqüinos colhidos em quatro estados diferentes (Goiás, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Sul) foram encontrados 20,5% de positivos para VSA, 4,4% para VSV-Ind, 1,8% para VSV-NJ e 0,9% para o vírus Cocal. Dentre os soros dos animais silvestres pesquisados foram encontrados 7,7% de positivos em morcegos e 33,5% de positivos em saguis (*Primate - Callitrichidae*) para o VSA. Os autores ainda afirmam que somente os sorotipos Alagoas e Cocal foram isolados no Brasil (ANDRADE et al., 1981).

Em um estudo da ocorrência em pequenos mamíferos, foram colhidas onze espécies diferentes de roedores silvestres sendo que sete delas apresentaram anticorpos para VSV, entre quais somente uma para o VSV-Ind e uma para VSV-NJ sendo as outras 5 restantes para ambos os vírus. No mesmo estudo, foram também colhidos 4966 insetos hematófagos, entretanto, não foi obtido sucesso no isolamento do vírus (JIMENEZ et al., 2000).

O soro de mais de 100 alpacas (*Artiodactyla - Camelidae*) do sul da Sierra Peruana foram examinados para a pesquisa de anticorpos contra diferentes vírus que infectam os animais domésticos. Neste estudo, foi observado que as alpacas podem se infectar com os vírus: parainfluenza-3, vírus respiratório sincicial bovino, herpesvírus bovino-1, vírus da língua azul, border disease, vírus da influenza-A, rotavírus, vírus da raiva, VSV, vírus da febre aftosa e vírus do ectima contagioso (RIVERA; MADEWELL; AMEGHINO, 1987).

Fletcher et al. (1991), colheram soros de veados da cauda branca (*Odocoiles virginianus, Artiodactyla - Cervidae*) de 1985 a 1989, na Ilha de OssaBaw, GE. Realizando teste de soro neutralização para VSV, os autores observaram a presença de anticorpos somente para o sorotipo New Jersey com a prevalência de 43% nos cinco anos.

Ubigo e Mclean (1995), colheram morcegos neotropicais de diferentes áreas da Guatemala para determinar a presença e distribuição de anticorpos contra dez diferentes vírus. Entre eles encontraram anticorpos neutralizantes contra VSV, entre os demais vírus pesquisados.

A ocorrência de animais silvestres soropositivos para o VSV–NJ na América do Norte é relativamente comum e as diferentes espécies acometidas podem representar uma diversidade de *habitats* e nichos ecológicos distintos (Quadro 1), contudo, isto pode determinar um denominador comum para a identificação do reservatório ou do ciclo epidemiológico (FLETCHER; STALLKNECHT; JENNEY, 1985).

Nome vulgar	Espécie
Carneiro montanhês	<i>Ovis canadensis</i>
Lince americano	<i>Felis rufus</i>
Coiote	<i>Canis latrans</i>
“Rato silvestre”	<i>Peromyscus maniculatus</i>
Alce	<i>Cervus elaphus</i>
Porco selvagem	<i>Sus scrofa</i>
Esquilo cinzento	<i>Sciurus carolinensis</i>
Camundongo	<i>Mus musculus</i>
“Rato mexicano de madeira”	<i>Neotoma mexicana</i>
Veado	<i>Odocoileus hemionus</i>
Gambá	<i>Didelphis virginianus</i>
Antilocapra	<i>Antilocapra americano</i>
Mão pelada	<i>Porcyon lotor</i>
“Rato de pedra”	<i>Peromyscus difficilis</i>
“Rato de pés branco”	<i>Peromyscus leucopus</i>
Veado de cauda branca	<i>Odocoileus virginintus</i>
Perus selvagens	<i>Meleagris gallopavo</i>

Quadro 1 -Relação de espécies selvagens descritos soropositivos para o vírus da estomatite vesicular na América do Norte - São Paulo - 2003

2.6.6 Distribuição geográfica

O VSV é encontrado nas Américas, desde Canadá até a Argentina. O sorotipo New Jersey e o Indiana são encontrados em áreas enzoóticas nos Estados Unidos, México, América Central, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colômbia, Peru e Equador (ACHA ; SZYFRES, 1986; LÓPEZ INZAURRALDE et al., 1997).

O sorotipo Cocal pode ser encontrado em Trinidad no Brasil e na Argentina. O sorotipo Alagoas ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia (ACHA ; SZYFRES, 1986; LÓPEZ INZAURRALDE et al., 1997).

2.6.7 Ocorrência no homem

No homem, as manifestações podem ser de forma aguda, autolimitante, tendo a freqüência de ocorrência desconhecida, uma vez que os sinais e sintomas se assemelham com a influenza, dificultando o diagnóstico. Normalmente, são descritos casos em pessoal de laboratório, tratadores de animais e em comunidades rurais (ACHA; SZYFRES, 1986; PATTERSON; MOTT; JENNY, 1958). A busca por anticorpos neutralizantes, em populações residentes, em locais enzoóticos pode ser elevada, no Panamá foram encontradas populações em que o acometimento dos adultos ultrapassava 90% (JOHNSON et al., 1969). No Brasil, o mesmo comportamento foi observado, em uma comunidade rural, quando ocorreu o isolamento do VSA pela primeira vez (ANDRADE, 1974).

OBJETIVOS

- a) Avaliar a capacidade de eliminação do VSA pela tilápia nilótica, experimentalmente inoculada, para a água.
- b) Desenvolver um modelo experimental de transmissão do VSA, utilizando a água como via de transmissão, a tilápia nilótica como fonte de infecção e o cobaio como hospedeiro susceptível.
- c) Avaliar o papel dos peixes, utilizando como modelo biológico a tilápia nilótica, na transmissão do VSV.
- d) Propor um modelo de ciclo epidemiológico do VSA, destacando o papel da água como via de transmissão.
- e) Padronizar uma técnica de RT-PCR para a detecção do VSA, em amostra de tecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Viroses Veterinárias (DESP/IV/UFRRJ) e Laboratório de Virologia (VPS/FMVZ/USP), contou com o apoio constante do Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Doenças Parasitárias, ambos pertence ao VPS/FMVZ/USP e Instituto Biológico de São Paulo para a elaboração de parte deste trabalho.

4.1 VÍRUS

Foi utilizado o VSA pertencente a coleção do Centro Panamericano de Febre Aftosa, com título $10^{8.5}$ TCID/0,02 mL e, o VSV-Ind foi fornecido pelo IMPPG/UFRRJ e RNA extraído do VSV-Ind pelo Instituto Biológico de São Paulo para desenvolvimento de técnicas moleculares.

4.2 CÉLULAS

A célula BHK₂₁ (Baby Hamster Kidney), clone 13, foi cedida pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa do Rio de Janeiro. Esta linhagem de célula é originária de hamster recém nascido e foi utilizada para a propagação, titulação e identificação do VSA.

4.3 TILÁPIAS

As tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) pertencem à família *Cichidea*, neste trabalho foram utilizadas as tilápias, chamadas de juvenis, com peso médio de 5 g. Esta espécie foi escolhida para este trabalho porque suportam bem o calor, são robustas e possuem poucas exigências respiratórias (HUET, 1983; STICKNEY, 1986).

As tilápias utilizadas no experimento foram doadas por um criador particular do Município de Japeri, RJ.

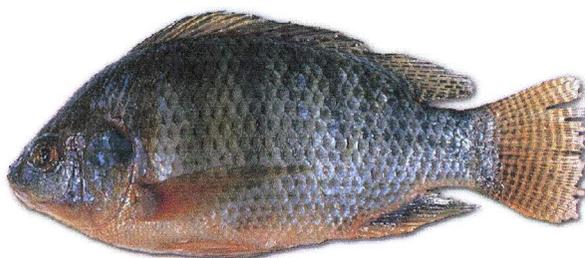


Figura 1 - Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) pertencente à família *Cichidea*

4.4 COBAIOS

Seguindo restrições imposta pelo Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, foram utilizados cobaios (*Cavia porcellus*) como representante dos possíveis hospedeiros mamíferos susceptíveis, em detrimento aos eqüinos. Os cobaios foram oriundos da Fundação Oswaldo Cruz com o peso dos animais variando de 200 a 250 gramas.

4.5 ÁGUA

A água utilizada no experimento é a mesma distribuída pela CEDAE (Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro) para toda a região do Grande Rio. Esta água foi mantida sob aeração constante, com o objetivo de eliminar por evaporação, todo o cloro adicionado à mesma na estação de tratamento da CEDAE, bem como favorecer a oxigenação, só sendo transferida para os aquários depois de passadas 48 horas de aeração.

O processo de aeração da água foi realizado com uma bomba submersa modelo Better 250 com potência de 60 W e vazão de 250 litros por hora.

4.6 CULTIVO CELULAR

As células foram propagadas com o meio de cultura de células MEM-Glasgow modificado com pH 6,8 obtido através da utilização de CO₂.

As passagens celulares foram realizadas quando a monocamada apresentava-se completa, realizando a técnica a seguir descrita:

a) Desprezar o meio antigo.

b) Adicionar tripsina a 0,25% no volume suficiente para cobrir o fundo da garrafa, deixar a tripsina lavar as paredes opostas à camada de célula e, por último, lavar a monocamada e desprezar a tripsina.

c) Repetir esta operação duas vezes e, na segunda vez, manter a tripsina atuando por um ou dois minutos, aguardar que estas se desprendam.

d) Quando estas estiverem se desprendendo, agitar com pipeta para auxiliar a desagregação da monocamada.

e) Terminada a individualização, suspender em MEM-Glasgow modificado com 10% de soro bovino e distribuir em garrafas ou tubos.

f) Incubar em estufa a 37 °C.

A manutenção das células no laboratório consistia na distribuição destas em três ambientes: na bancada, na estufa e congeladas em nitrogênio líquido.

As garrafas de cultivo que se encontravam na bancada, já possuíam a monocamada completa e constituíam-se em uma reserva pronta para o uso, permanecendo em temperatura ambiente para diminuir a velocidade de crescimento. Aquelas que foram incubadas em estufa consistiam em garrafas cujas células

estavam em franco desenvolvimento. As células congeladas em nitrogênio líquido foram utilizadas somente na falência dos outros dois ambientes.

4.7 PREPARO DA SUSPENSÃO VIRAL

Inicialmente o VSA recebido foi diluído na proporção de 1/10 e inoculadas com 0,5 mL de suspensão viral em 10 garrafas tipo xarope de cultivo celular, com volume de 5 mL e posteriormente congeladas a - 20 °C. Esta primeira passagem foi considerada como amostra padrão.

Sucessivas passagens em célula foram realizadas no sentido de produzir massa antigênica suficiente para o desenvolvimento do trabalho. Periodicamente, alíquotas do VSA congeladas, a - 20 °C, em diferente datas sofriam controle de virulência através da titulação periódica

4.7.1 Titulação da suspensão viral

O vírus foi previamente titulado em placa de 96 poços, no Laboratório de Virose Veterinária do DESP/IV/UFRRJ, pelo método de Reed e Muench (1938) antes de serem iniciados os trabalhos.

4.8 INOCULAÇÃO EM PEIXES

O experimento teve como data inicial o dia chamado de alfa (α), momento no qual os peixes se apresentavam adaptados ao novo ambiente com paredes de vidro, espaço reduzido e com a densidade populacional elevada. Os peixes foram considerados adaptados ao aquário quando não foi mais observada mortalidade, vinham à superfície para se alimentar e a coloração da água, não era permanencia turva. Este período de adaptação durou em torno de uma semana. Procedeu-se à inoculação neste mesmo dia e foram colhidas amostras de soro dos cobaios. O preparo do inóculo foi realizado a partir da diluição do VSA de referência em MEM-Glasgow a 1/10 e inoculados 0,1mL por via intraperitoneal em cada peixe.

4.8.1 Inoculação experimental em tilápias

Os peixes foram inoculados por via intraperitoneal com 0,1 ml de suspensão viral. A inoculação intraperitoneal foi realizada na linha Alba, no ponto médio entre a cloaca e o externo (Figura 2). Após a inoculação os peixes passaram a ser monitorado no sentido de observar alterações comportamentais em decorrência do processo de inoculação.

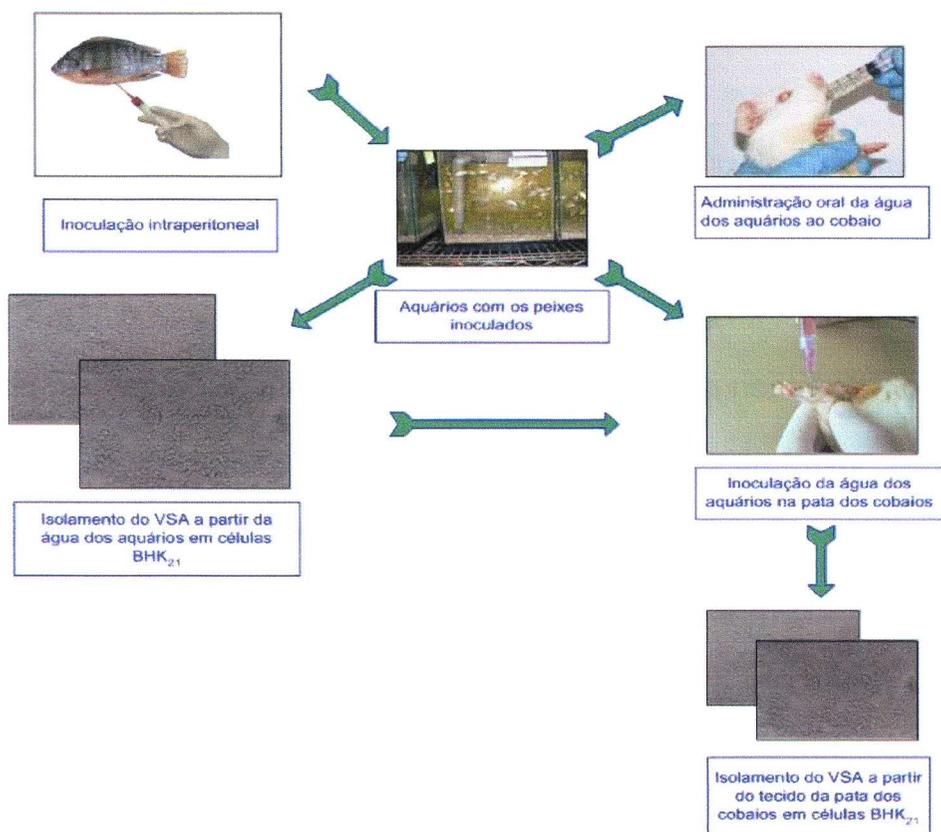


Figura 2 - Resumo esquemático do modelo epidemiológico desenvolvido para o estudo da transmissão do VSA, entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaios (*Cavia porcellus*) através da água – São Paulo - 2003

4.8.2 A transmissão para os cobaios

O ciclo experimental envolvendo peixes e cobaios iniciou-se com a colheita de sangue, por via intra-cardíaca, dos cobaios para a realização das comparações sorológicas entre os diversos dias de colheita nos dias subseqüentes. Diariamente foi colhida água de os dois aquários para o monitoramento virológico. O fornecimento de água dos aquários para os cobaios foi iniciado também neste dia (Figura 3). Foram administrados por via oral 5 mL de água, para cada cobaio com um intervalo de tempo de duas horas, durante oito dias seguidos, iniciando-se às oito horas da manhã e terminando às dezoito horas da tarde. O volume final de água dos aquários fornecida para cada cobaio por dia foi de 30 mL. Durante todo experimento os animais receberam água somente dos aquários. A segunda colheita de soro e a necropsia de um cobaio foram realizadas quinze dias após a administração da água para os animais (Quadro 2). Quarenta e oito dias após a primeira administração da água para os animais, foram realizadas a terceira colheita de soro e a necropsia de outro cobaio (Quadro 2). Na necropsia foram colhidos os seguintes materiais, de cada animal: linfonodos, placa de Peyer, cérebro, coração, baço, intestino, rim, fígado.

O inóculo fornecido por via oral consistia do homogeneizado da água circulante de os dois aquários utilizados. Parte da água dos aquários, aproximadamente 25% do volume total, era trocada a cada três dias, sendo retirado principalmente o sedimento acumulado no fundo do aquário.

Dias do Experimento	Atividade realizada
α	Colheita de soros dos cobaios
β	Inoculação intraperitoneal dos peixes
1	Início da administração de água ao cobaios
2	Administração de água ao cobaios
3	
4	
5	
6	
7	
8	Término de administração de água ao cobaios
15	Colheita de soro dos cobaios e necropsia
48	

Quadro 2 - Atividades realizadas durante os dias do experimento de inoculação experimental em tilápias a transmissão para os cobaios - São Paulo - 2003



Figura 3 - Administração oral de água, dos aquários com peixes inoculados com o VSV Alagoas, para os cobaios. Observar marcação de identificação na orelha dos animais. São Paulo 2003.

4.9 PROVA DE SORONEUTRALIZAÇÃO

A prova de soroneutralização foi realizada em monocamadas de cultivo celular, em microplacas de 96 cavidades de fundo chato. Foram utilizados os soros dos cobaios que ingeriram a água dos aquários, o vírus da VSA a 100 TCID₅₀ e células BHK₂₁.

Os soros foram "inativados" a 56°C durante 30 minutos e posteriormente diluídos de forma seriada a partir de uma suspensão de 1/10 até 1/80. Foram utilizadas duas fileiras para cada soro. Volumes iguais do soro diluído e vírus foram incubados a 37°C por 60 minutos para que a neutralização sucedesse. Posteriormente, 20 µl dessa mistura foi adicionada aos poços correspondentes e completados com meio manutenção até 200µl. As placas foram mantidas em estufas com atmosfera de 5% de CO₂ e incubada por 48 horas.

As cavidades que apresentaram efeitos citopáticos foram considerados negativas para a presença de anticorpos neutralizantes para o VSA. O título foi dado pela recíproca da maior anteriormente ao aparecimento do efeito citopático (OIE, 1996).

4.10 ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CULTURA CELULAR

Foram triturados os órgãos dos cobaios (fígado, baço, cérebro, linfonodos mesentérico, linfonodos mandibulares e cérebro) que receberam a água dos

aquários por via oral, através de sucessivas passagens por seringa com agulha 40/12 mm até desfazer os fragmentos e centrifugados a 1000 g por 30 minutos a 5°C. Os tecidos das patas dos cobaios inoculados por via intradérmica foram triturados, diluídos na proporção de 1/10 p/v e centrifugado segundo o procedimento anteriormente descrito. Os sobrenadantes de ambas as suspensões foram preservados e desprezaram-se os precipitados.

Antecedendo o momento da inoculação em cultivo celular, o material centrifugado foi diluído com MEM-Glasgow na proporção de 1/10. O meio de crescimento das células foi desprezado e o cultivo celular foi inoculado com 10 % do volume da cavidade da placa.

O controle de células não sofreu nenhum tipo de inoculação sendo trocado somente o meio de cultivo pelo mesmo utilizado na inoculação. O controle do vírus padrão era constituído pelo cultivo de células inoculada com VSA para confirmar a sua eficiência e servir como controle positivo.

Após a inoculação nas células, aguardou-se 1 hora para a adsorção do vírus à célula e a cada 15 minutos as placas eram suavemente agitadas. Posteriormente, foi completado o volume final com meio de manutenção. A leitura foi realizada a cada 24 horas a partir do momento da inoculação, durante quatro dias, anotando-se os resultados em planilha.

4.11 HISTOPATOLOGIA

Os cobaios de número 6 e 9 que ingeriram água dos aquários, dos peixes inoculados, foram sacrificados, tendo seus órgãos colhidos e enviados para diagnóstico histopatológico. Os órgãos utilizados no exame diagnóstico foram o cérebro, placa de Peyer, coração, baço, intestino, rim, fígado linfonodos mandibulares e mesentéricos. Os órgãos colhidos foram conservados em formol a 10% e enviados para exames histopatológicos na Sanidade Animal SAP/EMBRAPA RJ.

Posteriormente, foram enviados, para diagnóstico, tecidos das patas dos cobaios inoculados no coxim plantar com o isolado em cultivo celular e com a água do 13º dia pós-inoculação.

4.12 DETECÇÃO DO VSV PELA TÉCNICA DE REACÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA COM TRANSCRIPTASE -REVERSA (RT-PCR)

4.12.1 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada no Laboratório de Virologia da FMVZ-USP. Utilizando o protocolo de RT-PCR proposto por Rekik e Dea (1994) com algumas modificações realizadas por Brandão e Gregori (informação verbal)¹.

¹ Informações fornecidas por Brandão e Gregori no Laboratório de Virologia VPS/FMVZ-USP em 2003.

Durante o trabalho de padronização do RT-PCR foram utilizadas as amostras padrões cultivadas em células e amostras padrões misturadas com macerado de órgãos de peixe. A extração das amostras padrões cultivadas em células iniciou-se a partir do item "d" e a partir do item "a", quando foi testada com macerado de órgãos. O protocolo de extração seguiu as etapas descritas abaixo.

- a) Preparar suspensões a partir de macerado de tecido a 10% (p/v) em PBS 0,01M / BSA 0,1% pH 7,2 ou meio de cultivo celular (MEM).
- b) Cortar os órgãos em pequenos fragmentos com tesoura e macerar através passagens sucessivas pela seringa.
- c) Homogeneizar em vórtex e centrifugar a 12.000 g durante 30 minutos a 4 °C, colhendo o sobrenadante.
- d) Em tubos tipo eppendorf adicionar 0,75 mL de Trizol®(Invitrogen™) e para cada 0,25 mL do sobrenadante da suspensão de órgãos.
- e) Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente.
- f) Adicionar 0,2 mL de clorofórmio (para cada 0,75 mL de Trizol®) e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.
- g) Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente.
- h) Centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.
- i) Transferir a fase aquosa para outro tubo (\pm 500 μ L).
- j) Adicionar 0,5 mL de álcool isopropílico (para cada 0,75 mL de Trizol utilizado no item "b").
- k) Incubar por 10 minutos à temperatura ambiente.
- l) Centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.
- m) Desprezar o sobrenadante e adicionar 1mL etanol 75% (1mL de etanol a 75% para cada 0,75 mL de Trizol utilizado no item quatro).

- n) Homogeneizar em vórtex.
- o) Centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4 °C.
- p) Secar o sedimento e re-suspender em 15 µl de água DEPC².
- q) Incubar a 56°C por 10 minutos.

4.12.2 Transcrição reversa

A RT-PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da FMVZ-USP. Utilizando o protocolo de RT-PCR proposto por REKIK e DEA (1994) com algumas modificações realizadas por Brandão e Gregori³.

Durante a padronização da técnica da RT-PCR, inicialmente, foram utilizadas amostras de vírus padrão cultivados em células BHK₂₁, na determinação da melhor temperatura de hibridização dos *primers* (gradiente de temperatura) e, posteriormente, com a melhor temperatura de hibridização determinada, foi realizado o limiar de detecção.

Este gradiente de temperatura fornece um intervalo de diferentes temperaturas em que possibilita a determinação da melhor temperatura de hibridização dos *primers* à sua seqüência gênica complementar, através da observação da intensidade da banda no gel de agarose. Durante a padronização foram utilizadas as seguintes temperaturas presentes no Quadro 3.

²Água DEPC: Adicionar 0,01% (v/v) de dietilpirocarbonato em água destilada, deixar em repouso por 18h e autoclavar.

Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temperaturas (°C)	50,1	50,4	51,1	52,2	53,4	54,7	56,1	57,4	58,6	59,6

Quadro 3 - Intervalos de temperaturas utilizados no gradiente - São Paulo – 2003

Visando a detecção do VSV foram desenhados três novos *primers* utilizando o programa Primers3 ((Howard Hughes medical Institute, MIH,NHGRI, 2003), dois para o gene da polimerase (VSIPS/VSIPA e CARPS/CARPAS) e um para a nucleoproteína (VSNS/VSNA). Após exaustivas modificações no protocolo, os primers desenhados para a nucleoproteína não se mostraram eficientes na detecção do VSV.

Os *primers* VSIPS/VSIPA tiveram como alvo um segmento de 362 bp, localizado no gene da polimerase (L) aproximadamente entre 5122 e 5485 bp. Este fragmento foi escolhido após o alinhamento de várias seqüências gênicas do VSV Ind e VSV-NJ utilizando o programa ClustalW v. 1.4 de alinhamento genético.

A escolha do par de *primers* CARPS/CARPAS teve como alvo um segmento de 1258 bp, localizado no gene da polimerase (L) aproximadamente entre 8652 e 9909 bp. O *primers* utilizados nos trabalhos estão presentes no quadro 4.

³ Informações fornecidas por Brandão e Gregori I no Laboratório de Virologia VPS/FMVZ/USP em 2003.

Primer	Seqüência (5' - 3')	Posição no gene	Tamanho do fragmento
CARP (senso)	CTG GGA GAT CAR AAT TWC GAC TT	8652 - 8674	1258
CARPAS (anti-senso)	CCC TCC HGA HCC GTC TCC ACA	9909 - 9889	
VSIPS (senso)	TGG GAT GGA GTT CTT G	5122 - 5138	362
VSIPA (anti-senso)	CTG ACT TTG CCT TTG A	5468 - 5485	

Quadro 4 – Principais seqüências, posição no gene e tamanho do fragmento de dois pares de *primers* desenhados durante os trabalhos de tese - São Paulo - 2003

4.12.3 Síntese de c-DNA (RT)

Inicialmente, preparou-se a solução para a síntese de c-DNA; esta fase também é conhecida como transcrição reversa. Alguns cuidados nos procedimentos foram observados, tais como, manter em gelo a solução de preparo para a síntese de c-DNA durante todo o tempo até ser colocada no termociclador e o RNA viral extraído após a desnaturação deve ser colocado imediatamente no gelo. A reação para a síntese de c-DNA seguiu os seguintes passos:

- a) Em tubos tipo Eppendorf, adicionar 4 μ L de tampão RT (Gibco BRL®), 2 μ L de cada dNTP, 2 μ L de DTT (10 mM), 2 μ L do primer senso e anti-senso, 2 μ L de água ultrapura (MilliQ®) previamente tratada com dietilpirocarbonato (0,01%), 1 μ L (200 U) da enzima transcriptase reversa (M-MLV Rttase® – Invitrogen™).
- b) Desnaturar RNA viral extraído a 95 °C durante 5 minutos e adicionar 7 μ L desse RNA viral extraído desnaturado, totalizando volume final de 20 μ L por amostra.

c) Manter a 42 °C durante 60 minutos.

4.12.4 Amplificação pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Esta reação foi realizada em um volume final de 50 μL , somando 5 μL do produto da síntese de c-DNA (item anterior), 8 μL de cada dNTP a 1,25mM, 5 μL de tampão para PCR (Gibco BRL®), 2,5 μL de cada um dos dois *primers* (S1s e S1as) na concentração de 10pmol/ μL , 2,0 μL de MgCl_2 a 50 mM, 0,5 μL da enzima Taq DNA polimerase (1,25 U) (Gibco BRL®) e 25,25 μL de água ultrapura (MilliQ®). Foram feitos 40 ciclos de 94 °C durante 1 minuto (denaturação), 60 °C durante 1 minuto (hibridização) e 72 °C durante 2 minutos (alongamento), após os quais seguiram 74 °C durante 10 minutos.

4.12.5 Detecção do produto amplificado

Após a amplificação, 10 μL do produto da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE (Tris-HCl 0,089 M pH 8,3, ácido bórico a 0,089 M e EDTA 2mM) em voltagem adequada à dimensão do gel (1-10 V/cm), fazendo-se corar o gel em banho de água com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo. Foram consideradas positivas as amostras que produziram uma banda correspondente ao segmento de 1258 e 362 bp flanqueada pelos *primers*

CARPS e CARPAS e, VSIPS e VISPA, respectivamente, conforme comparado com padrão de peso molecular incluído em cada corrida.

Como padrão positivo foi utilizada a amostra do VSA e, como padrão negativo, sobrenadante de cultivo de células da linhagem BHK₂₁.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram relacionados às alterações anatomopatológicas, isolamento, prova de soroneutralização dos cobaios e técnicas de diagnóstico molecular. Estes podem ser observados, juntamente com a seqüência de eventos realizados do modelo epidemiológico desenvolvido para o estudo da transmissão do VSA, entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaios (*Cavia porcellus*) através da água, na figura 4.

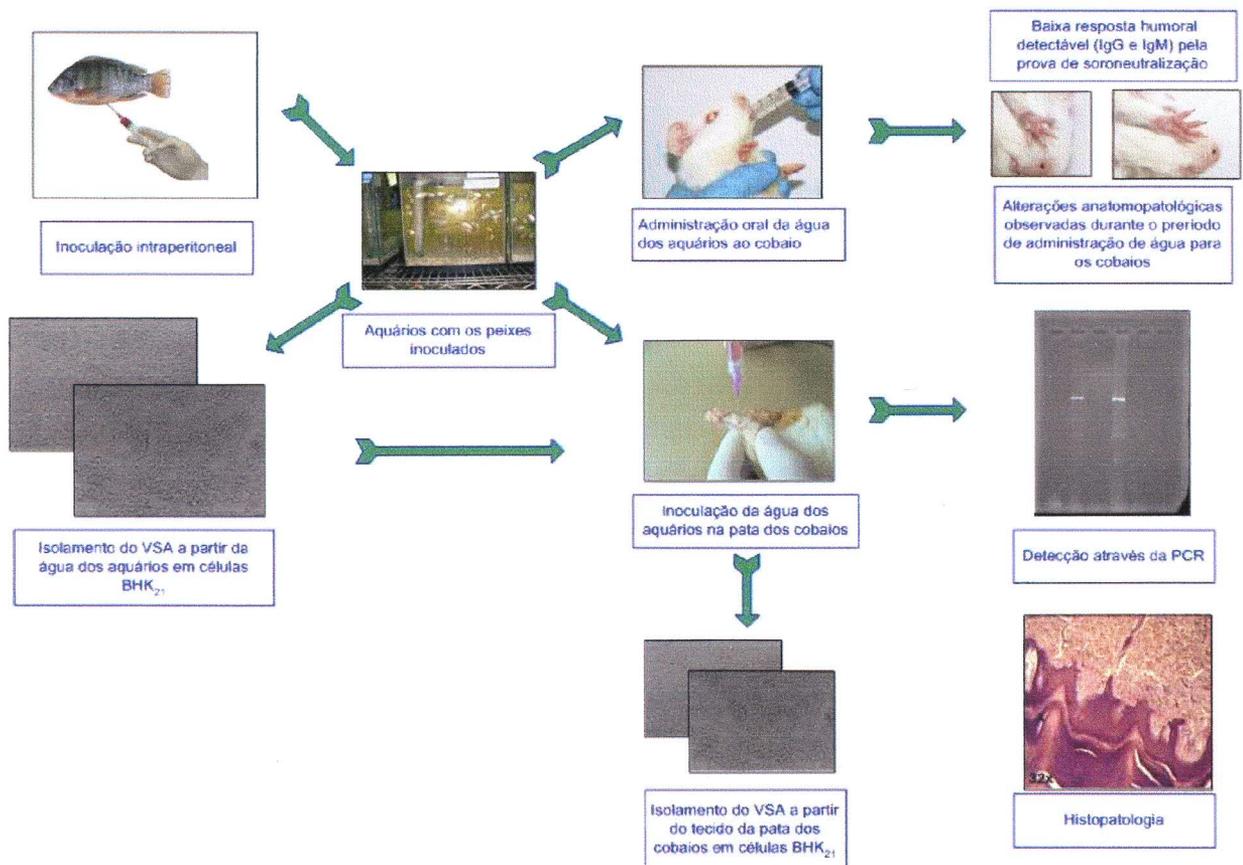


Figura 4 - Resumo esquemático e resultados obtidos a partir do modelo epidemiológico desenvolvido para o estudo da transmissão do VSA, entre tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente inoculadas e cobaios (*Cavia porcellus*) através da água – São Paulo - 2003

5.1 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

Os cobaios eram inspecionados diariamente, várias vezes ao dia, durante o momento da administração da água. No sétimo dia após a ingestão de água, foram observadas lesões no epitélio plantar de quatro animais (Figura – 5).

Foi observada, no animal de número sete, descamação da epiderme plantar nos membros anteriores e esta não apresentou aspecto erosivo ou formação evidente de vesículas.

O animal de número quatro apresentou formação semelhante a uma vesícula no coxim plantar, com a pele ligeiramente frouxa, mas não possuía líquido em seu interior e uma lesão mais profunda no dedo.

Foram também observadas lesões mais profundas com características incisivas nos dedos e região plantar, dos membros anteriores, dos animais de número um e dois.



Figura 5 - Lesões descamativas, no epitélio plantar do membro anterior direito em um cobaio, observadas a partir do sétimo dia após a administração da água dos aquários dos peixes inoculados com o VSV Alagoas - São Paulo - 2003

5.2 HISTOPATOLOGIA

O resultado dos exames histopatológicos não revelou a presença de alterações histopatológicas nos órgãos dos cobaios que ingeriram água dos aquários dos peixes inoculados com VSA. Quanto aos tecidos das patas dos cobaios foram enviados para diagnóstico e não retornaram em tempo hábil para serem incluídos nos resultados.

5.3 ISOLAMENTO

Os fragmentos de órgãos dos cobaios foram inoculados em cultivo celular de BHK₂₁, em placas de 24 cavidades. Foram realizadas três passagens cegas sucessivas de cada fragmento de órgãos colhidos 15 dias após a ingestão de água dos aquários, não sendo isolado nenhum material infeccioso dos fragmentos de órgãos.

A água dos aquários foi oportunamente preparada para o isolamento em cultivo de célula, seguindo os passos descritos no item 4.10 e foi possível realizar o isolamento viral a partir da água do 13º dia pós-inoculação dos peixes por via intraperitoneal.

A inoculação em célula da suspensão oriunda do tecido da pata dos cobaios resultou em efeito citopático semelhante ao do VSA, já na sua segunda passagem, o que se confirmou nas sucessivas passagens realizadas posteriormente.

5.4 PROVA DE SORONEUTRALIZAÇÃO DOS COBAIOS

Na prova de soroneutralização foram utilizados os soros dos cobaios que receberam a administração de água dos aquários por via oral. Os soros colhidos no dia que antecedeu a inoculação dos peixes, 15 e 48 dias após o início da administração do inóculo por via oral. O resultado desta prova de soroneutralização encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 – Resultado da soroneutralização realizada com os soros de cobaios colhidos em diferentes dias do experimento - São Paulo - 2003

Número do animal	Título Ac-N antes da ingestão de água	Título Ac-N 15 dias após a ingestão de água	Título Ac-N 48 dias após a ingestão de água
1	0	Sacrificado	----
2	0	10	10
3	0	10	20
4	40	10	
5	Sacrificado	----	----
6	0	Sacrificado	----
7	0	10	10
8	20	10	10
9	10	Sacrificado	----
10	10	0	10
11	10	0	20
12	Sacrificado	----	----
sn	0	20	20

5.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Na padronização da técnica de reação da polimerase em cadeia com transcriptase-reversa (RT-PCR) para a detecção do VSA foram realizados o gradiente de temperatura e o limiar de detecção em tecido de peixe (Figuras 6, 7 e 8) a partir de modificações propostas por Brandão e Gregori (Informação pessoal)¹.

5.5.1 Padronização da técnica de reação da polimerase em cadeia com transcriptase -reversa (RT-PCR) para a detecção do VSA

O primer para a nucleoproteína não se mostrou eficiente para o diagnóstico, uma vez que em nenhuma tentativa observou-se o aparecimento de bandas de tamanho de fragmento esperado nas amostras controle. Entretanto, os *primers* desenhados para o gene da polimerase se mostraram eficientes na detecção do genoma do VSV. O par de primer VSIPS/VSIPA amplificou somente o genoma do VSV Indiana e não foi efetivo para o VSA. Em contrapartida, o par de primer CARPS/CARPAS conseguiu amplificar um fragmento do mesmo segmento tanto para o vírus VSV-Ind quanto para o VSA.

O gradiente de temperatura utilizado na reação teve como padrão a temperatura de 55 °C e com variação de ± 5 °C onde encontramos resultado positivo em todas as temperaturas testadas para o VSA. (Figura - 6). A capacidade de detecção do VSA diluído em tecido de peixe foi de 10^{-3} (Figura 7)

¹ Informações fornecidas por Brandão e Gregori no Laboratório de Virologia VPS/FMVZ/USP em 2003.

Várias amostras do VSA cultivadas em épocas e em células diferentes foram submetidas ao diagnóstico pela RT-PCR e todas as positivas confirmaram a eficiência por este método (Figura 8).

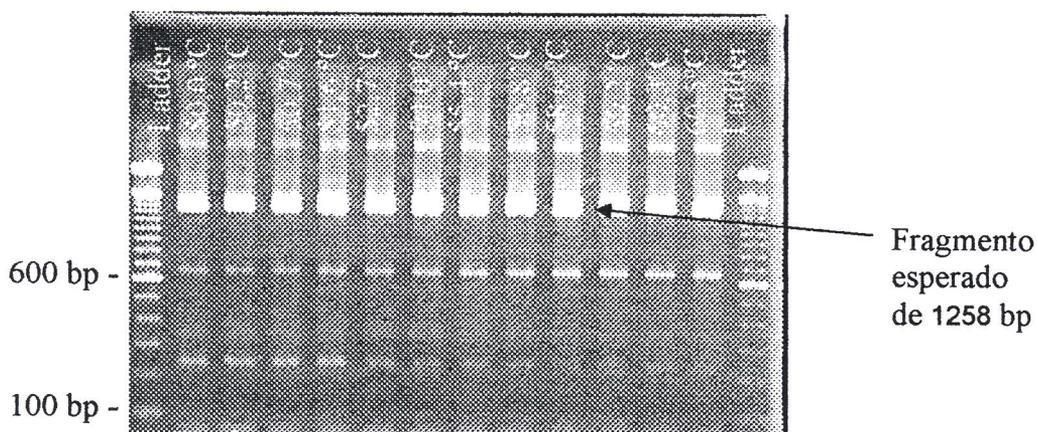


Figura 6 - Resultado do gradiente de temperatura para o par de primers CARPS/CARPAS para os vírus VSV-Ind e VSA - São Paulo - 2003

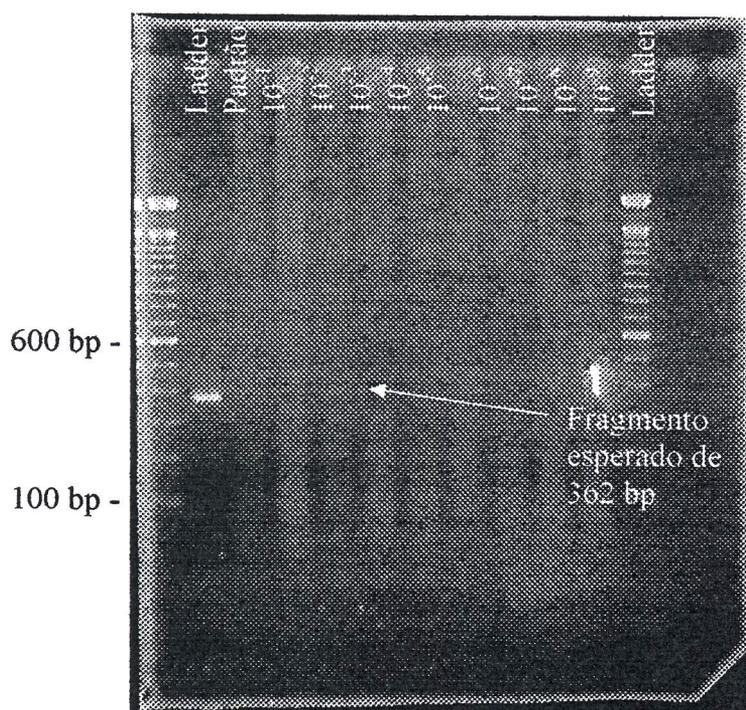


Figura 7 - Limiar de detecção para o par de primers VSIPS/VSIPA para o VSV-Ind em tecido de peixe - São Paulo - 2003

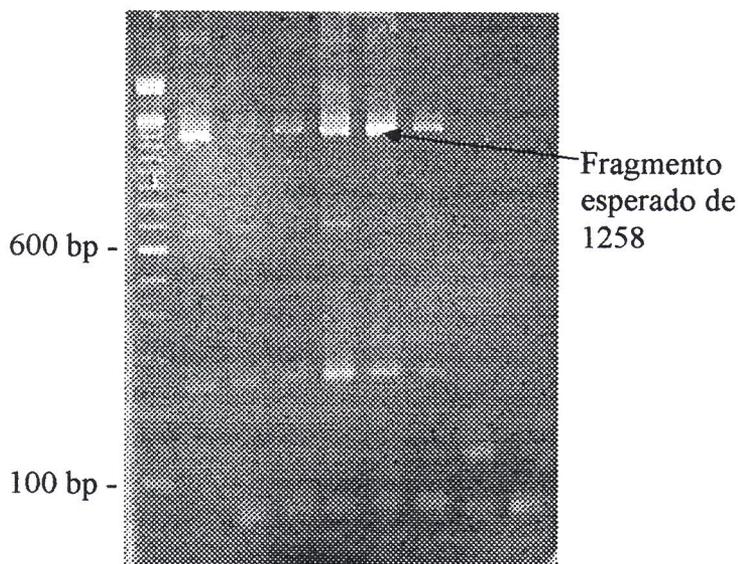


Figura 8 - Resultado da amplificação de um fragmento do gene da polimerase utilizando o par de primers CARPS/CARPAS para as diversas amostras de VSA - São Paulo - 2003

5.5.2 Detecção do VSA em tecido de cobaio pela técnica de reação da polimerase em cadeia com transcriptase - reversa (RT-PCR)

Foi pesquisada a presença de fragmento do gene da polimerase nos órgãos e tecidos dos cobaios, na água dos aquários e nos cultivos de células com efeito citopático positivo. Foi considerada positiva, pela técnica de RT-PCR, a quinta passagem em cultivo celular da amostra isolada a partir do tecido da pata do cobaio, inoculado por via intradérmica,.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Desde as primeiras descrições epidemiológicas de surtos de VS, de um modo geral, são citadas associações entre os surtos e a proximidade com uma fonte de água corrente (HANSON, 1952; HANSON; RASMUSEN, 1957), mas não são descritas tentativas de isolamento de partículas virais da água.

Um dos fatores que caracterizam tanto as doenças veiculadas por vetores como as pela água é a habilidade de se disseminar por longas distâncias, provocando a enfermidade em um hospedeiro susceptível em local distante do hospedeiro infectado (BOOTS; SASAKI, 1999). A água pode desempenhar uma variedade de papéis na transmissão de agentes infecciosos, tais como: é fonte exógena de exposição; como também responsável pela manutenção do nível endêmico e, ainda, via secundária de manutenção do nível endêmico (CHICK et al., 2001).

Estas observações podem sugerir que os rios sejam os caminhos ou fatores de risco para a VS. Todavia, a maioria dos proprietários de rebanhos utiliza esta área ou áreas próximas para o pastejo dos animais. Diversos estudos vem sendo realizados no sentido de agregar maior quantidade de informações relativas aos fatores que condicionam a manutenção e a transmissão do VSV. Os resultados obtidos nos estudos dos fatores de risco demonstram a existência de uma associação da doença com uma íntima proximidade com águas correntes (BRIDGES et al., 1995; HURD et al., 1999). Através dessas demonstrações pode-se afirmar que os surtos nos Estados Unidos consistentemente seguem os maiores cursos de águas no sentido norte durante o verão (BRIDGES et al., 1995)

A manutenção de animais a uma distância menor ou igual a quatrocentos metros de uma fonte de água corrente aumenta significativamente o risco do desenvolvimento da doença. Assim como a proximidade com a água é um fator significativo para a transmissão do vírus, o acesso dos animais ao pasto corrobora para um ligeiro aumento do risco de as propriedades possuírem animais positivos para VS (HURD et al., 1999).

Em uma investigação epidemiológica realizada no surto ocorrido em uma propriedade no sudoeste de Idaho, EUA, em 1982, foi descrito como a principal via de transmissão o contato direto entre os animais e fomites. Neste caso particular, foi ressaltado que uma quantidade excessiva saliva eliminada pelos animais enfermos contaminou praticamente todas as águas aquecidas e a disseminação da doença entre os animais perdurou por um período maior que o usual, após a chegada do inverno. Nessa propriedade, foi isolado o VSV de uma das amostras de água (LEDER et al., 1983). Em 1998, Azeredo-Lima et al., baseado nas características descritas anteriormente, demonstraram que os peixes podem sofrer infecção através de inoculações intraperitoneais ou quando estes são imersos em solução infectante. Outra importante demonstração realizada foi a franca eliminação de formas infectantes do vírus presente no peixe para a água. Estes resultados demonstraram que o VSV pode se multiplicar nos peixes e ser veiculado pela água e se constituiria uma das vias de transmissão deste vírus.

Semelhantemente a este comportamento do VSV, os agentes veiculados pela água tais como *Cryptosporidium parvum* e *Escherichia coli* (0157:H7), podem ser transmitidos a partir da água para os humanos através da água de bebida, por contato entre indivíduos e, do indivíduo infectado para o meio ambiente que posteriormente encontrará outro hospedeiro susceptível. Estes múltiplos caminhos,

bem como a dependência de exposição, prevalência de infecção na população sugerem que o modelo epidemiológico de estudo deve estar voltado para o risco do ambiente em vez de quantificar o risco de infecção (CHICK et al., 2001).

Já na década de 1960 a 1970, foram relatadas ocorrências de surtos no Estado do Colorado e em três outros Estados, EUA, em que a transmissão da doença clínica de animal para animal em situação onde a íntima associação não era aparente. Contudo, foi observado que os casos iniciais, como também muitos destes desenvolveram-se mais tarde, abrangendo em animais que pastavam (JONKERS, 1969). Os ambientes envolvidos nos surtos da década anterior, citada anteriormente, apresentavam-se encharcados por algumas semanas ou permaneceram encharcados (HANSON, 1952; HANSON; RASMUSEN, 1957).

Outro típico elemento observado na epidemiologia da VS é a sua distribuição irregular entre diversas propriedades. Essa distribuição irregular é facilmente constatada no momento em que se observa a presença de casos em uma determinada propriedade e a total ausência de casos nas propriedades adjacentes e novamente o surgimento de casos em uma propriedade distante (JONKERS, 1969).

Dentre as teorias de transmissão proposta para a VS, existe a da transmissão por artrópodes baseada em alguns aspectos que apontariam a possível transmissão por vetor: incidência sazonal, limitações ecológicas, a velocidade e modo de disseminação (HANSON, 1952). Colaborando com esta teoria o VSV foi isolado de vários dípteros, (*Culicoides variipennis*, *Simuliidae* spp., *Chloropidae* spp., *Anthomyiidae* spp., *Musca domestica* e *M. autumnalis*), mas não se sabe ainda se esses insetos podem desempenhar o papel de vetor biológico e contribuir para a disseminação da doença (WALTON et al., 1983).

É dada uma relativa importância para a *Lutzomia* na epidemiologia da VS, porém a sua associação com regiões endêmicas não é clara. O VSV pode ser transmitido diretamente entre os animais, mas esta proporção sobre o total da taxa de incidência ainda continua completamente desconhecida (ATWILL et al., 1993).

Por outro lado, a teoria de transmissão por vetores pode ser contestada quando analisamos os seguintes aspectos: primeiro, o local de desenvolvimento das lesões só é obtido quando realizamos inoculações locais; segundo, a transmissão por artrópodes não explicaria o porquê de pastos distantes serem repetidamente afetados enquanto o adjacente não; terceiro, a repentina aparição da enfermidade com grande quantidade de casos no mesmo dia, inferia em uma grande quantidade de vetores infectados e presumivelmente um surto entre os animais silvestres. A ocorrência de surtos nem sempre coincide com o aumento de mosquitos e não são em todos os surtos que é possível o isolamento do vírus a partir dos mosquitos; quarto, como explicaria a pequena ocorrência em animais estabulados se a veiculação se dá por insetos?; quinto, a densidade do rebanho parece possuir menor influência na transmissão da VS (JONKERS, 1969).

Todavia o elemento crítico da evidência necessária para incriminar os insetos como vetores biológicos de VSV-NJ não foi ainda completamente confirmado e, o *status* de vetor deve ser ainda estabelecido (SCHIMIDTMANN et al., 1997). Uma fase importante do ciclo de vida dos arbovírus é produzir sustentáveis níveis de viremia em seus hospedeiros de modo a possibilitar a infecção do vetor quando este se alimenta na fase virêmica do hospedeiro (RODRIGUEZ, 2002). A WHO define vetor um artrópode (hospedeiro invertebrado) aquele que transmite o vírus de um vertebrado a outro através da picada. Isto, ainda não foi demonstrado para o VSV. Todavia o *S. vittatum* é capaz de transmitir o vírus pela picada, mas continua

desconhecida a maneira pela qual este adquire o vírus na natureza (MEAD et al., 1999).

Na Costa Rica, os rebanhos, mantidos em uma altitude entre 500 a 1500 m, possuem maior risco de serem soropositivos em comparação a outras altitudes. Em adição, a maior quantidade de larvas de *Lutzomias* está presente em fontes e rios situados entre 1000 e 1500 metros de altitude (ATWILL et al., 1993). Baseados nestas informações, podemos inferir que as *Lutzomias* poderiam estar sendo infectadas em sua fase larvar e, posteriormente, eclodiriam albergando o vírus.

A viremia não tem sido relatada em porcos ou em outras espécies de animais domésticos e tem sido sugerido que estes seriam o fim do ciclo envolvendo a transmissão por vetores biológicos (RODRIGUEZ, 2002).

Na ausência de viremia e veiculação por vetores, a transmissão mecânica e por contato e, ainda, por outras vias podem representar a mais importante via de transmissão depois que o vírus foi introduzido na população de animais domésticos. (STALLKNECHT et al., 2001). Na Ilha de Ossabaw, Geórgia foi verificado que a transmissão por contato de VSV-NJ não resultou em um longo período de manutenção viral nas populações de animais domésticos. Contudo, isso pode representar a maior via de transmissão depois que o vírus foi introduzido no rebanho. Esta transmissão, especialmente nos casos clínicos, também pode servir como amplificador do vírus, favorecendo a transmissão por vetores mecânicos e contaminação ambiental. Isto pode representar uma importante situação na qual uma subsequente transmissão viral por via não sistêmica para uma população de insetos (STALLKNECHT et al., 2001).

A transmissão por vetores tem sido descrita por vários autores e, Mead et al. (2000) concluíram que não é necessário um hospedeiro virêmico para que um inseto

se torne infectado uma vez que os insetos podem se infectar através do mecanismo da co-alimentação.

A transmissão do VSV entre os porcos selvagens na ilha de Ossabaw, Geórgia, provavelmente envolve múltiplas vias de transmissão. Os resultados desses estudos demonstram que estes porcos podem ser infectados por uma variedade de vias de transmissões, tais como contato, vetores mecânicos, inoculação intranasal e intradérmica utilizando uma dose infectante de $10^{-0,7}$ TCID (STALLKNECHT et al., 2000).

A não conversão sorológica, dos cobaios testados na prova de soroneutralização (resultados do item 5.4), demonstra que a via oral não é uma provável via de estimulação da resposta imunológica humoral detectável por esta prova, uma vez que foi possível isolar e identificar a presença deste agente na água (resultados do item 5.3). Ficando demonstrado de que água se caracteriza como via de transmissão da Estomatite Vesicular, possibilitando a infecção dos hospedeiros susceptíveis (cobaios) através de inoculações experimentais em coxim plantar destes animais (item 5.5.2).

Sendo os peixes capazes de eliminar na água partículas virais infectantes (itens 5.3 e 5,5.2), estes podem ser inseridos no ciclo epidemiológico da Estomatite Vesicular como fonte de infecção, pois são capazes de eliminar no meio ambiente um determinado agente infeccioso e utilizando uma ou outra via de transmissão, este agente alcançou o hospedeiro susceptível (Figura 9).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os outros que avaliaram os fatores de risco para o desenvolvimento da Estomatite Vesicular (BRIDGES et al., 1995; HANSON, 1952; HURD; MCCLUSKEY; MUMFORD, 1999; MARONEY; FREIER, 1995). A água é apresentada como uma das principais vias de

transmissão no ciclo epidemiológico, tendo os peixes como fonte de infecção e provável envolvimento de outros elementos aquático na manutenção e dispersão do vírus entre diferentes propriedades (Figuras 6 e 9).

O presente trabalho procurou demonstrar que o peixe pode ser considerado como uma fonte de infecção do VSA e a água uma das vias de transmissão do vírus, fornecendo novas informações, dados para a compreensão da epidemiologia dessa enfermidade. Deste modo, vimos propor uma visão mais ampla das multicasualidades que favorecem a manutenção do vírus no meio ambiente (Figura 9). Esta manutenção seria o resultado da associação de diversos fatores descritos anteriormente com cada um favorecendo uma determinada via de transmissão. O resultado dessa interação são as diversas possibilidades de transmissão discutidas. De acordo com as variáveis ambientais, tais como, características físicas e biológicas, uma via sofreria um maior favorecimento em detrimento da outra. Impróprio seria dizer a não existência de transmissão por determinada via quando existem dados consistentes da sua manifestação (JONKERS, 1969).

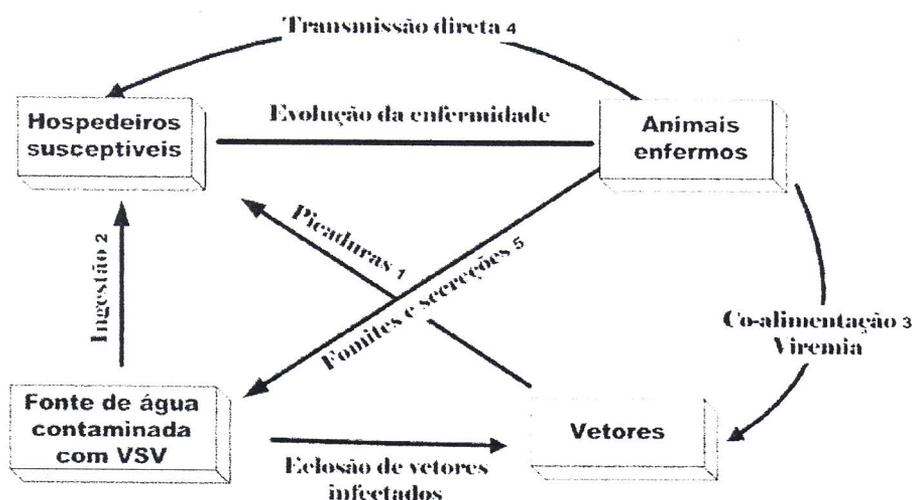


Figura 9 - Representação esquemática do ciclo de multicasualidades proposto para Vírus da Estomatite Vesicular apresentando as diversas vias de transmissão propostas por vários autores.

Nota: 1 - Transmissão por vetor (WALTON *et al.*, 1983); 2 - Água como via de transmissão (AZEREDO-LIMA *et al.*, 1998; LEDER *et al.*, 1983); 3 - Transmissão por co-alimentação (STALLKNECHT *et al.* 2001); 4 - Transmissão direta (STALLKNECHT *et al.*, 2001); 5 - Transmissão por fomites (LEDER *et al.*, 1983) - São Paulo - 2003

Durante a década passada, foram obtidos grandes avanços na tecnologia de diagnóstico por PCR através de sinais de DNA e a técnica de amplificação de seqüências alvos resultou em um processo chave no diagnóstico molecular. Essas técnicas são conceitualmente simples, com alta especificidade, sensíveis e passíveis de completa automatização (ELNIFRO *et al.*, 2000).

A técnica da PCR, com uma ou outra variação, está cada vez mais presente nos laboratórios de diagnósticos e está sendo implementada na rotina de diagnóstico, bem como no ensino de graduação e pós-graduação. Nos laboratórios de diagnóstico as limitações do uso da PCR restringem-se principalmente aos custos de operação (ELNIFRO *et al.*, 2000).

O sucesso de uma amplificação específica depende da taxa de hibridização dos *primers* com a sua seqüência alvo e da taxa de alongamento das seqüências desejadas na qual os *primers* se ligaram. Outros fatores tais como, *primers* pobremente desenhados, temperatura de hibridização e solução tampão podem interferir na eficiência da hibridização dos *primers* com a sua seqüência alvo. O alongamento da seqüência alvo está principalmente relacionado com a atividade enzimática e com a disponibilidade de elementos essenciais como a dNTPs. A otimização da PCR passa por diversas dificuldades, dentre as quais podem ser citadas a baixa sensibilidade ou especificidade, determinação de alvos preferenciais específicos para a amplificação.

Seguindo as características descritas acima, a reação da PCR para os *primers* desenhados durante os trabalhos de tese conseguiram detectar fragmentos

do genoma do VSV em tecido de peixes diluídos 1/1000. O gradiente de temperatura nos proporcionou uma larga margem de atividade (50 a 60 °C).

A escolha do par de *primers* CARPS/CARPAS teve como alvo um segmento de 1258 bp, localizado no gene da polimerase (L) Esta região foi escolhida com base nas comparações realizadas por Björklund, Higman e Kurath (1996) quando estudaram a glicoproteína e as junções gênicas de *Rhabdovirus* de peixes, vírus Spring Viremia of Carp e HIRAME Rhabdovirus, com outros *Rhabdovirus*. Observou que os *Rhabdovirus* de peixes apresentam uma grande relação entre si e distantes de outros vírus de mamíferos. Observou também que as junções gênicas são altamente preservadas entre SVCV e VSV-Ind. Baseadas nestas observações, o par de *primers* CARPS/CARPAS foi desenhado com o sentido de possuir uma grande sensibilidade para os VSV (item 5.5.1).

Os *primers* foram desenhados com a finalidade de detecção do Vírus da Estomatite Vesicular sem distinguir os sorotipos, lembrando que no Brasil foram isolados os sorotipos Alagoas e Cocal. O sorotipo VSV-Ind foi identificado somente por provas de soroneutralização. Desta maneira, estes *primers* atuaram de forma decisiva no diagnóstico molecular da Estomatite Vesicular no Brasil. Estes *primers* genéricos são capazes de se ligarem ao VSA e VSV-Ind e, amplificar um segmento do gene da polimerase (L) (item 5.5.1 e 5.5.2). Até o presente momento não foi, ainda, verificada nenhuma publicação de um fragmento de seqüência gênica do VSA.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- a) Decorridos 13 dias pós-inoculação experimental foi possível obter o isolamento do VSA oriundo da água, em que os peixes foram mantidos, em cultivo de células de linhagem BHK₂₁, demonstrando que a tilápia nilótica é capaz de eliminar partículas infecciosas deste vírus na água.
- b) Foi desenvolvido um modelo experimental de transmissão do VSA utilizando a tilápia nilótica como fonte de infecção, segundo o qual fica demonstrado que estes peixes eliminaram partículas virais na água, e que esta última se caracteriza como via de transmissão possibilitando a infecção dos hospedeiros susceptíveis (cobaios) através de inoculações experimentais em coxim plantar destes animais.
- c) A tilápia nilótica pode ser considerada como uma fonte de infecção, que por sua vez, foi capaz de eliminar um agente infeccioso no meio ambiente e, utilizando uma determinada via de transmissão, este agente alcançou o hospedeiro susceptível.
- d) Baseado no modelo experimental de transmissão do VSA desenvolvido, os peixes podem ser inseridos no ciclo epidemiológico da Estomatite Vesicular como fonte de infecção, sendo capazes de eliminar na água partículas virais infectantes, destacando o papel da água como via de transmissão.

- e) Fica padronizada uma técnica de RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente, útil para a detecção direta do Vírus da Estomatite Vesicular Alagoas e Indiana em amostras de tecidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington D.C: Organizacion Panamericana de la Salud. 1986. 989 p.
- ANDRADE, C. M. **Estomatite vesicular no Brasil**. 1974. 120 f. Tese (Livro Docência em Virologia) Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1974.
- ANDRADE, C. M.; MATTOS, I. G.; SILVA, A. G.; ROSAS, C. E. E.; LAGROTA, M. H. C.; GUIMARÃES, C. J. Vesicular Stomatitis In Brazil II – Inquérito Epidemiológico Em Equídeo, Mrocegos E Sagüis. **Anais de Microbiologia, Instituto de Microbiologia. UFRJ**, v. XXVI, p. 47-51, 1981.
- ANDRADE, C. M.; ROSAS, C. E. E.; AMORIM, L. M.; MOTA, J. P.; TEIXEIRA, E N.; SANTOS, N F. Vesicular Stomatitis In Brazil I, **Anais de Microbiologia, Instituto de Microbiologia UFRJ**, v. XXV, p. 81-87, 1980.
- ATWILL, E. R.; RODRIGUEZ, L. L.; HIRD, D. W.; ROJAS, O. Environmental and host factors associated with seropositivity to New Jersey and Indiana vesicular stomatitis viruses in Costa Rican cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, n. 4, p. 303 -314, 1993.
- AZEREDO LIMA, C. H.; ANDRADE, C. M.; RANGEL FILHO, F. B.; ARAÚJO F. B. Estomatite vesicular Alagoas (VSA) em Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Possível implicação epidemiológica – 1ª observação. **Revista Brasileira da Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 151-155, 1998.
- BANERJEE, A. K. The transcription complex of vesicular stomatitis virus. **Cell**, v. 3, n. 48, p. 363-364, 1987.
- BARRERA, J. D.; LETCHWORTH, G. Persistence of Vesicular Stomatitis Virus New Jersey Rna in Convalescent Hamsters. **Virology**, v. 291, p. 453-464, 1996
- BILSEL, P. A.; NICHOLS, T. Polymerase errors accumulating during natural evolution of the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus Indiana serotype isolates. **Journal of Virology**, v. 64, n. 10, p. 4873-4883, 1990.

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4 ed. São Paulo: FMVZ – USP, 2003. 84 p.

BILSEL, P. A.; ROWE, J. E.; FITCH, W. M.; NICHOL, S. T. Phosphoprotein and nucleocapsid protein evolution of vesicular stomatitis virus New Jersey. **Journal of Virology**, v. 64, n. 6, p. 2498-2504, 1990.

BISHOP, D. H. L. **Rhabdoviruses**. Florida. USA: CRC Press, 1979. 194 p.

BJÖRKLUND, H. V.; HIGMAN, K. H.; KURATH, G. The glycoprotein gene and gene junction of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships other rhabdoviruses. **Virus Research**, v. 42, p. 65-80, 1996.

BOOTS, M.; SASAKI, A. "Small worlds" and the evolution of virulence. Infection occurs locally and at a distance. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 266, p. 1933 – 1938, 1999.

BRICKER, B. J.; SNYDER, R. M.; FOX, J. W.; VOLK, W. A.; WAGNER, R. R. Monoclonal antibodies to the glycoprotein of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): a method for preliminary mapping of epitopes. **Virology**, v. 161, n. 2, p. 533-540, 1987.

BRIDGES, V. E.; McCLUSKEY, B. J.; SALMAN, M. D.; HURD, H. S.; DICK, J. Review of the vesicular stomatitis outbreak in the Western United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 211, n. 5, p. 556 – 560, 1997.

CHICK, S. E.; KOOPMAN, J. S.; SOORAPANTH, S.; BROWN, Ž. M. E. Infection transmission system models for microbial risk Assessment. **The Science of the Total Environment**, v. 274, p. 197 – 207, 2001.

COHEN, J. ; LENOIR, G. Ultrastructure et morphologie de quatre Rhabdovirus de poissons. **Annales. Rech. Vét.** v. 5, p. 443 – 450, 1974.

COMER, J. A.; TESH, R. B.; MODI, G. B.; CORN, J. L.; NETTLES, V. F. Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: Replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v. 42, n. 5, p. 483-490, 1990.

CORN, J. L.; COMER, J. A.; ERICKSON, G. A.; NETTLES, V. F. Isolation of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype from plebotomine sand flies in

Georgia. American. **Journal Tropical Medical Hygiene**. v. 42, n. 5, p. 476-482, 1990.

COTTON, W. E. Vesicular Stomatitis in its relation to the diagnosis of foot and mouth disease. **Veterinary Medical Association**, , p. 313-332, 1926.

CUPP, E. W.; MARE, C. J.; CUPP, M. S.; RAMBERG, F. B. Biological transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey) by *Simulium vittatum* (diptera: Simuliidae). **Journal Medical Entomology**, v. 29, n. 2, p. 137-140, 1992.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. American Society for microbiology: Optimization and application in diagnostic virology, clinical **Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559 – 570,. 2000.

FLETCHER, W. O.; STALLKNECHT, D. E.; JENNEY, E. W. Serologic surveillance for vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. **Journal of Wildlife Disease**, v. 2, n. 2, p. 100-104, 1985.

FLETCHER, W. O.; STALLKNECHT, D. E.; KEARNEY, M. T.; EERNISSE, K. A. Antibodies to vesicular stomatitis New Jersey type virus in white-tailed deer on Ossabaw Island, Georgia, to 1989. **Journal Wildlife Diseases**, v. 27, n. 4, p. 675 - 680, 1991.

HANSON, R. P. The natural history of vesicular stomatitis. **Bacteriology Review**, n. 16, p. 179 – 204, 1952.

HANSON, R. P.; RASMUSEN, A. F. A epizootiology of vesicular stomatitis. **American Journal of Public Health**, v. 47, p. 205 – 209, 1957.

HEINY, E. Vesicular stomatitis in cattle and horses in Colorado. **North American Veterinary Association**, n. 6, p. 726-730, 1945.

HUET, M. **Tratado de piscicultura**. 3ª ed. Castelló, Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 1983. 215 p.

HURD, S. H.; MCCLUSKEY, B. J.; MUMFORD, E. L. Management factors affecting the risk of Vesicular Stomatitis on Western U.S. livestock operations. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 9, p. 1263-1268, 1999.

JIMENEZ, A. E.; HERRERA, F. V.; SALMAN, M. O.; HERRERO, M. Survey of small rodents and hematophagous flies in three sentinel farms in a Costa Rican Vesicular Stomatitis endemic region. **Annals of Academy New York of Sciences**, n. 916, p. 417 – 430, 2000.

JOHNSON, K. M.; TESH, R. B.; PERALTA, P. H. Epidemiology of Vesicular Stomatitis Virus: some new data and a hypothesis transmission of Indiana Serotype. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 155, n. 12, p. 2133 – 2141, 1969.

JONKERS, H. A. The epizootiology of the vesicular stomatitis viruses: a reappraisal. **American Journal of Epidemiology**, v. 86, p. 286 – 291, 1969.

KRAMER, W. L.; JONES, R. H.; HOLBROOK, F. R.; WALTON, T. E.; CALISHER, C. H. Isolation of arboviruses from *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Colorado during an epizootic of vesicular stomatitis New Jersey. **Journal Medical Entomology**, v. 27, n. 4, p. 487-493, 1990.

LEDER, R. R.; MAAS, J.; LANE, V. M.; EVERMANN, J. F. Epidemiologic investigation of vesicular stomatitis in a dairy and its economic impact. **The Bovine Practitioner**, n. 18, p. 45-49, 1983.

LETCHWORTH, G. J.; RODRIGUES, L. L.; BARREIRA, D. J. Vesicular Stomatitis. **The Veterinary Journal**, v. 157, p. 239 – 260, 1999.

LÓPEZ INZAURRALDE, A.; MOREIRA, C. E.; LOPEZ, J. W.; SÖNDAH, M. S. Distribución histórica de la Estomatitis Vesicular en Brasil, **Bolletín del Centro Panamericano Fiebre Aftosa**, v. 62-63, 1996-1997.

LORD, C. C.; TABACHNICK, W. J. Influence of nonsystemic transmission on the epidemiology of insect borne arbovirus: a case study of vesicular stomatitis epidemiology in western United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 3, p. 417- 426, 2002.

LUK, D.; MASTERS, P. S.; GILL, D. S.; BANERJEE, A. K. Intergenic sequences of the vesicular stomatitis virus genome (New Jersey serotype): evidence for two transcription initiation sites within the L gene. **Virology**, v. 160, n. 1, p. 88-94, 1987.

MANCARELLA, D. A.; LENARD, J. Interactions of wild-type and mutant M protein of vesicular stomatitis virus with viral nucleocapsid and envelope in intact virions.

Evidence from [125I] iodonaphthyl azide labeling and specific cross-linking. **Biochemistry**, v. 20, n. 24, p. 6872-6877, 1981.

MARONEY, S. A.; FREIER, J. E. Disease transmission in cattle and horse: spatial analysis of landscape features associated with Vesicular Stomatitis. US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Animal and health inception service center for epidemiology and animal health, >[1999?]. Disponível em: <Http://www.Esri.Com/Library/Userconf/Proc00/Professional/Papers/Pap622/P622.Htm> Acesso em: 10 out. 2000.

MCCLUSKEY, B. J.; MUNFORD, E. L.; SALMAN, M. D.; TRAUB-DARGATZ, J.J. Use Of Sentinel Herd To Study The Epidemiology Of Vesicular Stomatitis In The State Of Colorado. **Annals of the New York Academy**, v. 969, p. 205-208, 2002.

MEAD, D. G.; MARE, C. J.; RAMBERG, F. B. Bite Transmission of Vesicular Stomatitis Virus (New Jersey Serotype) to Laboratory Mice by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) **Entomological Society of America**, p. 410-413, 1999.

MEAD, D. G.; RAMBERG, F. B.; BESSELSSEN, D. G.; MARE, C. J. Transmission of Vesicular Stomatitis Virus from Infected to noninfected Black Flies co-feeding on nonviremic deer mice, v. 287, p. 485 – 487, Jan. 2000.

MUNFORD, E L; MCCLUSKEY, B J; TRAUB-DARGATZ, L; SCHIMITT, B J; SALMAN, M D.; Serologic Evaluation Of Vesicular Stomatitis Virus Exposure In Horse And Cattle In 1996. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 213, n. 9, p. 1265 -1269, 1998.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. In: **report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 6th**, 1995, Vienna. **Proceeding in the sixth report of the international committee on taxonomy of virose.**

NICHOL, S.T.; ROWE, J. E.; FITCH, W. M.; Glycoprotein evolution of vesicular stomatitis virus New Jersey. **Virology**, v. 168, p. 281-291. 1989.

NOZAWA, C. M.; ANDRADE, C. M. Relação Sorológica do VSV Alagoas com os demais membros do grupo da Estomatite Vesicular. **Anais de Microbiologia**, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, v. XXIII, p. 11-17, 1978

OIE. Manual of standard for diagnostics tests and vaccines. List A and B diseases of mammals, birds and bees. **Office international des epizooties. World organisation for animal health**, c. 2.1.2, p. 57 -65, 1996.

ORREGO, A.; ARBELAEZ, G. R.; VALBUENA, R. M.; ROCHA, J. R.; CARDONA M. C. B.; RUBIO, J. U. Evaluacion de campo de una vacuna contra la esfomatitis vesicular bovina. **Cenicafe** (Colombia), v.43 n. 4, p. 105-113, 1992.

PATTERSON, W. C.; MOTT, L. O.; JENNY, E. W. A study of Vesicular stomatitis in Man. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 1, p. 57 – 63, 1958.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoint. **American Journal Hygiene**, p. 493-497, 1938.

REIF, J. S.; WEBB, P. A.; MONATH, T. P.; ET AL Epizootic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: Infection in Occupational Risk Groups. **American Journal of Tropical Medicine and Hygeine**, v. 36, n. 1, p. 177-182, 1987.

REKIK, M. R.; DEA, S. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. **Archives of Virology**, v. 135, p. 319 – 331, 1994.

RIVERA, H.; MADEWELL, B. R.; AMEGHINO, E. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). **American Journal Veterinary Research**, v. 2, p.189 -191, 1987.

RODRIGUEZ, L. L. Emergency and Re-Emergency of Vesicular Stomatitis in the United States. **Virus Research**, v. 85, p. 211-219, 2002.

RODRIGUEZ, L. L.; BUNCH, T. A.; FRAIRE, M.; LLEWELLYN, Z. N. Re-Emergence Of Vesicular Stomatitis In Western United States Is Associated With Distinct Viral Genetic Lineages. **Virology**, v. 271, p. 171 -181, 2000.

RODRIGUES, L. L.; FITCH, W. M.; NICHOL, S. T. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. **Proclamed National Academy Science**, v. 93, p. 13030 -13035, 1996.

RODRIGUES, L. L.; VERNON, S.; MORALES, A. I.; LETCHWORTH, G. Serological Monitoring Of Vesicular Stomatitis New Jersey in Enzootic Region on Costa Rica. **American Journal Of Tropical Medicine Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 272 – 281, 1990.

SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 240 p.

SCHIMIDTAMANN, T. E.; TABACHNICK, W. J.; HUNT, G. J.; THOMPSON, L. H.; HURD, H. S., 1995 Epizootic of vesicular Stomatitis (New Jersey) in the western United States: an entomologic perspective. **Entomologic Society of America**, v. 36, n. 1, p. 1 – 7, 1999.

SCHUBERT, M.; HARMISON, G. G.; MEIER, M. Primary structure of the vesicular Stomatitis virus polimerase (L) gene: Evidence for a high frequency of mutation. **Journal of virology**, v. 51, n. 2, p. 505 – 514, 1984.

SCHUBERT, M; HARMISON, G. G.; SPRAGUE, J.; CNDRA, C. S.; LAZZARINI, R. A. In vitro transcription of Vesicular Stomatitis virus: iniciation with GTPat a specific site within th N cistron. **Journal of Virology**, v. 43, n. 1, p.166 – 173, 1982.

SPIROPOULOU, C.F.; NICHOL, S. T. A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of Vesicular Stomatitis Virus. **Journal of Virology**, n. 67, p. 3103 - 3110, 1993.

STALLKNECHT, D. E. VSV-NJ on Ossabaw Island, Georgia: the truth is out there. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 916, p. 431- 436, 2000.

STALLKNECHT, D. E.; PERZAK, D. E.; BAUER, L. D.; MURPHY, M. D.; HOWERTH, E. W. Contac transmission of Vesicular Stomatitis Vírus New Jersey in pig, **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, 2001.

STALLKNECHT, D. E.; NETTLES, V. F.; ERICKSON, G. A.; JESSUP, D. A. Antibodies to vesicular stomatitis virus in populations of feral swine in the United States. **Journal Wild Diseases**, n. 3, p. 320-325, 1986.

STICKNEY, R. R. **Culture of nonsalmonid freswater fishes**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986. 110 p.

STROZZI, P.; RAMOS-SACO, T. Teat vesicles and almost exclusive lesions in an extension outbreak of Vesicular Stomatitis (New Jersey strain) in milking cows, **Journal of American Veterinary Medicine Association**, p. 415 – 419, nov. 1953.

THOMSON, R. G. **Patologia veterinária especial**. 2^a ed. São Paulo: Manole, 1990. 256 p.

THURMOND, M. C.; ARDANS, A. A.; PICANSO, J. P.; MCDOWELL, T.; REYNOLDS, B.; SAITO. Vesicular Stomatitis Virus (New Jersey Strain) Infection In two californian dairy herds: an epidemiological studies, **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 191, n. 8, p. 15 - 20, 1987.

UBICO, S. R.; MCLEAN, R. G. Serologic survey of neotropical bats in Guatemala for virus antibodies. **Journal Wild Diseases**, v. 1, p. 1- 9, 1995.

VAN-LEEUWEN, J. A.; RODRIGUEZ, L. L.; WALTNER-TOEWS, D. Cow, farm, and ecologic risk factors of clinical vesicular stomatitis on Costa Rican dairy farms. **American Journal Tropical. Medical Hygiene**, v. 4, n. 53, p. 342 - 350, 1995.

VILLALOBOS, R; BARRERA, J. D. C.; VILLAMIL, L. C. Persistencia de los Virus de la Estomatitis Vesicular New Jersey e Indiana em Bovinos, Equinos y Porcinos Naturalmente Infectados. Disponível <http://Www.Panaftosa.Org.Br/Novo/Estomatitis/Men/ Memórias/Jose_Bar.../ Vill-Um.Ht> acesso em: 03 Setembro, 2001.

WALTON, P. E.; WEBB, P. A.; FRANCY, D. B. Vesicular stomatitis in wild caught insects. **Foreign Animal Disease Report (USDA)**, v. 2, n. 11, in Bull OIE v. 95, n. 48, 1983.

WEBB, P. A.; McLEAN, R. G.; SMITH, G. C.; ELLENBERGER, J. H.; FRANCY, D. B.; WALTON, T. E.; MONATH, T. P. Epizootic Vesicular stomatitis in wild Colorado, 1982: Some observations on the possible role of wildlife population in an enzootic maintenance cycle. **Journal of Wildlife Disease**, v. 23, n. 2, p. 192 – 198, 1987a.

WEBB, P. A.; MONATH, T. P.; REIF, J. S.; SMITH, G. C.; KEMP, G. E.; LAZUICK, J. S.; WALTON, T. E. Epizootic Vesicular Stomatitis in wild Colorado, 1982: Epidemiologic studies along the northern Colorado front range. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 1, p. 183 – 188, 1987b.

ZULUAGA, F. N.; YUILL, T. M. Estudios ecológicos de los virus de estomatite vesicular en Antioquia, Colombia, **Bolletín of Sanitation**, Panamá, v. 87, p. 389 - 404, 1979.