

SUPERVIVÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA TIPO O₁ EM CARÇAÇAS DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE, ANTES E APÓS O PROCESSO DE MATURAÇÃO

Ivo Gomes¹, Eliane Mattos Monteiro², Gilfredo C. Darsie¹,
Alberto K. Ramalho¹, Márcia Cristiane F. Safon³

¹Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS)

Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²CPPSUL/EMBRAPA, Bagé, RS, Brasil

³Frigorífico Alegretense, Alegrete, RS, Brasil

Foi estudada a sobrevivência do vírus da febre aftosa tipo O cepa O₁, Campos em carcaças de ovinos infectados experimentalmente. Nos ovinos sacrificados em estado febril às 48, 72 e 96 horas pós-infecção (HPI) foi detectado vírus antes e após a maturação das carcaças nos músculos Longissimus dorsi (LD) e Semimembranosus (SM) os quais não atingiram pH inferior a 6,0 durante o processo de maturação. Nos ovinos sacrificados às 120 HPI, 15 e 30 dias pós-infecção (DPI) não foi detectado vírus antes ou após a maturação das carcaças. Nas carcaças cujos músculos LD e SM ainda continham vírus após a maturação e que foram congeladas a -20°C, isolou-se vírus quando amostras desses músculos foram processadas quatro meses após o congelamento. Foram detectados vírus nos órgãos e gânglios dos ovinos sacrificados às 48, 72, 96 e 120 HPI. Nos órgãos, os rins apresentaram títulos de vírus que variaram de 10^{3,0} a 10^{3,7} DI₅₀. Nos gânglios pré-escapulares, submaxilares e amígdalas, os títulos variaram de 10^{1,8} até 10^{4,9} DI₅₀. Nos ovinos abatidos aos 15 e 30 DPI não se detectou vírus em nenhum órgão ou gânglios dos que foram estudados. Em ovinos sadios da mesma raça e idade dos utilizados no experimento e abatidos simultaneamente nos meses da realização do trabalho (verão) o pH das carcaças atingiu valores de 5,96 após 6 horas e 5,36 após 24 horas de maturação. Enfatiza-se a importância do conhecimento epidemiológico da região de onde se originam os ovinos destinados ao abate e o rigor do exame ante-mortem.

O rebanho de ovinos a nível mundial atinge aproximadamente um bilhão de cabeças, sendo a exploração dessa espécie animal atividade econômica importante em países como Austrália, Nova Zelândia e Grã Bretanha, todos livres de febre aftosa. Entretanto em muitos países da África e Ásia os quais também apresentam grande

população ovina, a febre aftosa ocorre de forma endêmica ou esporádica. Na Turquia, o número de ovinos e caprinos afetados por febre aftosa durante muitos anos foi superior ao de bovinos e búfalos infectados (22).

Na América do Sul a maior concentração de ovinos encontra-se nos países que compõem o MERCOSUL sendo que a Argentina apresenta o maior rebanho, seguido do Uruguai e Brasil.

O abate de ovinos a nível mundial é bastante significativo, atingindo aproximadamente 460 milhões de cabeças. Nos países do MERCOSUL a

Solicitar separatas ao :
Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS)

produção de carne ovina é estimada em torno de 181 toneladas/ano com a seguinte distribuição: Argentina 49%, Uruguai 35% e Brasil 16% (7).

No Brasil, principalmente nos estados do sul do país (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), o cruzamento de matrizes de lã com reprodutores de raças especializadas para a produção de carne vem evoluindo no sentido de permitir alterações radicais na produção e qualidade das carcaças (7).

Com exceção do Uruguai, hoje em processo de ser considerado livre da enfermidade sem vacinação, nos outros países do MERCOSUL a febre aftosa encontra-se ainda em fase de controle/erradicação, o que restringe a exportação de carnes para os países fora do circuito aftósico.

Há bastante tempo sabe-se que o vírus da febre aftosa pode sobreviver em certos tecidos animais em temperaturas normalmente usadas para o resfriamento e congelamento das carnes. A importância da sobrevivência do vírus está em relação com a epizootologia da enfermidade e nos países livres de febre aftosa os regulamentos são direcionados a minimizar os riscos de introdução ou difusão da enfermidade através de produtos de origem animal (13).

Após o abate do animal, a transformação de músculo em carne, processa-se mediante trocas bioquímicas, das quais a degradação do glicogênio muscular, através da glicose anaeróbica, é de fundamental importância. A rapidez na queda do pH no músculo (pH 7,2 para pH 5,5), deve-se à liberação de íons hidrogênio resultantes desse processo e é muito variável nas 24-48 horas, após o abate (10,30). Vários fatores podem influir para determinar a rapidez da queda do pH e o início do *rigor mortis*. Animais que são submetidos a estresse antes do abate, apresentam baixo nível de glicogênio e como consequência o pH final das carcaças torna-se alcalino ou próximo à neutralidade. Nesta condição, a carne apresenta coloração escura e alta capacidade de retenção de água em decorrência da pequena quantidade de ácido láctico produzida. Valores de pH 6,0 para alguns autores e 6,2-6,3 para outros, têm sido considerados como linha divisória entre a carne normal e a carne escura. Estas transformações ocorrem em carcaças de

bovinos, suínos e ovinos, porém com pouca importância econômica para esses últimos (1,18 24,25,26).

Outros trabalhos de metabolismo post-mortem em carcaças de ovinos sadios têm demonstrado que após o processo de maturação o pH atinge valores inferiores a 6,0 e que esse metabolismo estaria influenciado por uma série de fatores como dieta alimentar, estresse, estimulação elétrica no momento do abate, etc. (5,9,16,19, 28,33).

As normas sanitárias da Oficina Internacional de Epizootias (OIE) estabelecem que para exportação de carnes procedentes de países afetados por febre aftosa, antes da desossa, as carcaças hajam sido submetidas a um processo de maturação a uma temperatura de 2°C durante um período mínimo de 24 horas após o abate, no qual o pH da carne tenha atingido um valor inferior a 6,0 (21).

Com relação à carne de ovinos o Comitê Científico Veterinário da Comunidade Européia (Animal Health) em informe elaborado em 1993 menciona que "o pH final dos músculos de ovinos é geralmente mais alto que o de bovinos e que a probabilidade de alcançar um pH inferior a 6,0 é menor, principalmente nos meses de verão. Ademais sob condições de estresse existe menos glicogênio nos músculos de ovinos e desta forma a queda do pH será menor durante o processo de maturação" (8).

Geralmente a literatura registra apenas estudos de inativação do vírus da febre aftosa em carnes de bovinos. Em ovinos a literatura é escassa (6,27).

O objetivo deste experimento, incluindo alguns parâmetros indicativos de infecção, foi estudar a sobrevivência do vírus do tipo O, cepa O₁ Campos da febre aftosa em carcaças de ovinos infectados experimentalmente, antes e após o processo de maturação. Por outro lado, para demonstrar generalização da infecção, estudou-se o isolamento de vírus nos órgãos e gânglios dos animais infectados. Paralelamente aferiu-se o pH de carcaças de ovinos sadios abatidos rotineiramente em frigorífico especializado. O trabalho foi realizado propositalmente nos meses de verão quando o Comitê Científico Veterinário da

Comunidade Européia assinala que a probabilidade das carcaças atingirem pH inferior a 6,0 é menor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Vinte e cinco cordeiros da raça Corriedale, com idade em torno de três meses, foram selecionados do rebanho da EMBRAPA/CPPSUL (Bagé, Rio Grande do Sul), desmamados e mantidos em pastoreio e campo natural. Transcorridos dois meses do desmame, os animais foram enviados para o Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA), onde permaneceram por um período de 30 dias para adaptação, recebendo alimentação a base de alfafa (500 g/cordeiro dia) e ração comercial (250 g/cordeiro dia). Adicionalmente, de um total de 6734 ovinos sadios das raças Corriedale e Ideal abatidos em matança de rotina no Frigorífico Alegretense (Alegrete, Rio Grande do Sul,) foram selecionados 100 cordeiros, dos quais se tomou o peso vivo e das carcaças e o pH, antes e durante o período de maturação.

Vírus e inoculação. Vírus O₁ Campos com cinco passagens em ovinos, adaptado conforme descrito (2), foi inoculado por via intradermolíngua (IDL) em cada ovino no volume de um mililitro contendo $10^{5,6}$ DI₅₀.

Sangrias e exame clínico. Vinte e quatro horas pós-infecção (HPI) e nos dias subsequentes, foi tomada temperatura de cada animal, efetuado exame clínico para verificação de lesões linguais e podais e tomadas amostras de sangue heparinizado para estudo de viremia.

Abate. Foram realizados seis abates em grupos de três ovinos selecionados aleatoriamente. Os grupos foram identificados como 48, 72, 96 e 120 HPI e aos 15 e 30 dias pós-infecção (DPI). Antes do abate os animais foram pesados, apresentando um peso vivo médio de 15 kg e submetidos a uma dieta hídrica de 24 horas. O abate foi realizado conforme o procedimento comercial, sendo as carcaças suspensas pelo tendão de Aquilles.

Colheita de amostras. Logo após o abate foram obtidas amostras do músculo Longissimus dorsi (LD) entre a 11^a e 12^a costelas e do músculo

Semimembranosus (SM). Foram também colhidas amostras dos gânglios pré-escapular, poplíteo, submaxilar, mesentéricos, amígdalas, esôfago, coração, pulmão, fígado, baço e rim, conservadas em solução glicero fosfatada de pH 7,4-7,6 e mantidas a temperatura de -20°C até seu processamento.

Determinação do pH e temperatura. Foram colhidas amostras do músculo LD entre a 11^a e 12^a costelas e do músculo SM na primeira e após 24 horas do abate. A determinação do pH foi realizada conforme metodologia descrita (14,17). A temperatura foi determinada diretamente na carcaça nos músculos LD e SM na primeira e após 24 horas do abate, utilizando-se um termômetro marca Eletronic -Thermometer ama-digit ad 15th*. No frigorífico a obtenção do pH foi realizada com leitura direta na carcaça com medidor de pH digital, marca Tecnal, Mod. TEC-2*.

Maturação e congelamento das carcaças. A maturação das carcaças foi realizada em câmara de refrigeração mantida a temperatura de 4°C. Decorridas vinte e quatro horas de permanência a 4°C e após colheita de amostras dos músculos LD e SM, as carcaças foram transferidas para câmara de congelamento a -20°C, onde após quatro meses novas amostras dos músculos LD e SM foram obtidas.

Preparação das suspensões. As suspensões das amostras dos músculos e órgãos moles foram preparadas por homogeneização dos materiais em Omnimixer (Sorval Dupont Co. Inst. Div. Sorval, Operations, Newtown, Conn. 06470, USA*). Os gânglios foram triturados em grau com areia estéril. Em ambos casos foram preparadas suspensões a 20% dos materiais, utilizando-se como diluente uma solução buffer tampão de pH 7,4, centrifugando-se a 800g por 30 minutos.

Cultivos celulares. Tanto para titulação do sangue heparinizado como para as suspensões dos músculos, órgãos e gânglios foram utilizados cultivos de células IB-RS2 (23).

* A menção de firmas comerciais ou de seus produtos faz-se com fins de identificação e não implica seu endosso pelos autores ou suas respectivas instituições.

Titulações. O sangue heparinizado para estudo de viremia foi titulado pelo método de Dulbecco utilizando-se como meio semi sólido a goma karaia como descrito (3). Os títulos foram representados em UFP/ml. A titulação dos músculos, órgãos e gânglios foram realizadas em duplicata em microplacas Falcon de 96 orifícios. Os títulos em $\text{Log}_{10}/\text{ml}$ foram representados pela média das duas titulações.

RESULTADOS

Após inoculação e nos dias subsequentes, foi tomada a temperatura e realizada sangria dos animais para estudo de viremia. O quadro 1 mostra a média da temperatura e de viremia dos grupos de animais abatidos durante o experimento. As temperaturas estavam acima de 40°C às 24 HPI e os títulos virêmicos iguais ou superiores a $10^{2,15}$ UFP/ml às 24 e 48 HPI. Esses títulos declinaram sensivelmente às 72 HPI e às 96 HPI foram negativos. Nos ovinos abatidos às 48 e 72 HPI os quais apresentaram lesões linguais não houve tempo de generalização podal. Todos os animais abatidos posteriormente apresentaram lesões de

generalização em uma ou mais patas. Durante o experimento morreram sete animais.

No quadro 2 são mostrados os títulos de vírus detectados nos órgãos e gânglios dos ovinos infectados. Esses títulos foram detectados nos ovinos sacrificados até às 120 HPI, sendo negativos naqueles abatidos aos 15 e 30 DPI. Dos órgãos estudados, a maior concentração de vírus foi encontrada nos rins. Em apenas um ovino sacrificado às 72 HPI foi encontrado vírus no coração. Entre os gânglios estudados a maior concentração de vírus foi encontrada nos pré escapulares e submaxilares. Nas amígdalas a concentração de vírus também foi elevada.

O quadro 3 mostra a temperatura, pH e concentração do vírus detectado nos músculos LD e SM antes e após a maturação das carcaças. Os valores são apresentados individualmente para melhor compreensão e levando-se em conta que em alguns ovinos não se conseguiu detectar vírus. Em média houve uma perda de 59% entre o peso vivo e o peso da carcaça. Logo após o abate a temperatura dos músculos LD e SM foi de $28,5^{\circ}$ e $29,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Após o processo de maturação esses valores declinaram para $6,80^{\circ}$ e $6,75^{\circ}\text{C}$. Como se observa nos animais sacrificados às 48

HPI os títulos infecciosos nos músculos LD e SM foram mais elevados após a maturação. Naqueles sacrificados às 72 HPI os títulos estavam bastante elevados antes e declinaram após a maturação, embora o pH estivesse permanecido acima de 6,0. Somente foi detectado vírus no músculo SM de um ovino às 96 HPI após a maturação da carcaça, sendo o LD negativo. Nos abates de 120 HPI, 15 e 30 DPI não se detectou vírus antes ou após a maturação das carcaças. Houve pouca variação do pH nos músculos LD e SM dos ovinos abatidos até às 96 HPI. Dos seis ovinos abatidos às 120 HPI e 15 DPI somente em três o pH dos músculos LD e SM atingiram valores iguais ou inferiores a 6,0 após a maturação. Por outro lado nos três animais abatidos aos 30 DPI o pH caiu a 5,9 após a maturação.

Quadro 1. Temperatura e viremia dos ovinos infectados experimentalmente com o vírus O_1 Campos da febre aftosa

Horas/dias Grupos após abate	Horas após infecção (HPI)							
	Temperatura*				Viremia*			
	24	48	72	96	24	48	72	96
48HPI	40,5	40,8			2,15	2,15		
72	41,1	40,3	41,0		2,92	2,55	0,58	
96	41,2	40,9	41,6	40,6	2,33	2,14	0,39	-
120	41,1	40,7	41,6	41,3	2,77	2,48	0,39	-
15DPI	40,9	40,7	41,2	41,3	2,52	2,76	0,45	-
30	41,2	41,0	41,3	41,3	2,67	2,20	0,29	-

*Média de três animais
Viremia: Log_{10} UFP/ml
Temperatura: 0° Celsius
- = negativo

Quadro 2. Títulos do vírus tipo O₁ da febre aftosa em órgãos e gânglios de ovinos infectados experimentalmente

Órgãos/ Gânglios	Horas PI Identificação	48			72			96			120		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Esôfago*		2,9	1,7	1,6	-	1,7	-	2,60	-	-	-	1,7	-
Coração		-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-
Pulmão		1,8	-	-	-	3,5	3,5	-	3,5	-	2,1	-	2,2
Fígado		2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-
Baço		-	2,0	-	-	2,5	1,8	3,5	2,0	1,8	-	-	1,6
Rim		3,5	3,5	-	3,0	3,7	3,6	3,5	3,5	3,4	3,5	3,5	3,5
G. Pré escapular		4,0	2,8	3,7	3,2	4,7	3,5	3,7	3,7	-	3,7	3,7	3,7
G. Poplíteo		2,7	1,7	1,9	2,9	2,7	3,5	2,8	2,8	2,1	1,8	2,8	3,7
G. Sub maxilar		4,2	3,5	4,9	3,9	2,9	4,5	3,0	3,5	1,8	-	2,8	3,7
Amígdalas		3,1	2,7	3,6	3,6	3,1	3,8	3,5	3,5	2,1	2,4	3,2	3,7
G. Mesentérico		2,7	3,4	3,7	3,4	4,0	3,8	3,8	3,5	2,1	2,7	2,5	3,5

*Log₁₀/ml em cultivos de células IB-RS2

- = negativo

Imediatamente após o processo de maturação as carcaças foram congeladas a -20°C. Quatro meses após a permanência sob esta temperatura foram retiradas novas amostras para titulação de vírus (quadro 4). Nos ovinos n^{os} 1 e 3 sacrificados às 48 HPI e que apresentavam títulos elevados no músculo LD logo após a maturação, ainda foi encontrado vírus em concentração alta (10^{2,32} e 10^{3,0}). No músculo SM que tinha títulos baixos após maturação, não foi detectado vírus após o congelamento. Dos ovinos sacrificados às 72 HPI, o de n^o 4 com títulos elevados após maturação, foi negativo após congelamento. O de n^o 5, com título baixo no LD após maturação e negativo no SM, foi positivo para os dois músculos com título de 10^{1,85} após congelamento. Do mesmo modo o ovino de n^o 6 cujo LD foi negativo após a maturação apresentou título de 10^{1,75} após congelamento. Dos ovinos sacrificados às 96 HPI, o de n^o 7, negativo após maturação, apresentou títulos de 10^{1,65} e 10^{2,49}, nos

músculos LD e SM respectivamente, após congelamento.

Paralelamente a este experimento e para efeito de controle e comparação foram tomados dados de ovinos sadios das raças Corriedale e Ideal abatidos em matança de rotina no Frigorífico Alegretense. Este abate foi realizado durante os meses de janeiro e fevereiro (verão), simultaneamente aos experimentos em PANAFTOSA. Nesses animais a perda de peso vivo das carcaças foi de 64% na raça Ideal e 59% na raça Corriedale. A temperatura das carcaças antes da maturação foi de 25° e 18°C respectivamente para as raças Ideal e Corriedale. Após a maturação esses valores declinaram para 1,0° e 1,5°C. O pH inicial de 6,55, após 4 horas de maturação declinou para 6,1, atingindo valor de 5,96 após 6 horas. Daí em diante foi caindo gradativamente até o valor de 5,36 após 24 horas. Nas diversas categorias etárias de ovinos abatidos no período, no mesmo frigorífico, todos

Quadro 3. Temperatura, pH e título de vírus nos músculos LD e SM de ovinos infectados experimentalmente com vírus do tipo O₁ da febre aftosa, antes e após maturação das carcaças

Grupos Nº Ovino	Antes maturação						Após maturação						
	Temperatura °C		pH		Título*		Temperatura °C		pH		Título		
	LD	SM	LD	SM	LD	SM	LD	SM	LD	SM	LD	SM	
48 HPI													
1	27,0	29,0	6,5	6,4	0,87	-	10,0	8,0	6,3	6,2	4,16	1,60	
2	27,0	29,0	6,3	6,4	-	1,09	9,0	9,0	6,0	5,9	1,70	1,60	
3	26,9	27,8	6,8	6,6	2,56	2,40	8,0	10,0	6,9	ND	4,66	1,76	
Média	27,0	28,6	6,5	6,5	1,14	1,16	9,0	9,0	6,4	6,1	3,50	1,65	
72 HPI													
4	28,2	30,3	6,2	6,2	4,91	-	7,5	8,0	6,2	6,0	2,68	3,71	
5	28,4	29,8	6,7	6,5	4,16	2,09	6,0	6,0	6,7	6,4	1,62	-	
6	25,0	26,7	6,4	6,5	5,33	2,91	5,0	8,0	6,2	6,8	-	-	
Média	27,2	28,6	6,4	6,4	4,80	1,66	6,16	7,33	6,4	6,4	1,43	1,25	
96 HPI													
7	24,3	25,8	6,6	6,5	-	-	6,0	10,0	6,6	6,4	-	-	
8	27,4	27,8	6,4	6,4	1,70	1,00	6,0	5,0	6,2	6,4	-	0,87	
9	28,3	27,0	6,4	6,4	2,36	1,40	6,0	5,0	6,3	6,1	-	-	
Média	26,66	26,86	6,4	6,4	1,35	0,80	6,0	6,66	6,4	6,3	-	0,29	
120 HPI													
10	29,1	28,5	6,4	6,6	-	-	6,5	6,5	5,8	5,8	-	-	
11	29,4	30,5	6,5	6,5	-	-	7,4	5,8	6,3	6,4	-	-	
12	27,9	29,2	6,5	6,6	-	-	6,7	6,0	6,2	6,1	-	-	
Média	28,8	29,4	6,5	6,6	-	-	6,86	6,1	6,1	6,1	-	-	
Nº Ovino													
15 DPI													
13	31,0	32,2	6,4	6,8	-	-	6,8	5,0	6,6	6,4	-	-	
14	31,3	31,3	6,4	6,6	-	-	6,8	7,5	6,0	5,9	-	-	
15	28,9	29,9	6,5	6,5	-	-	6,4	6,0	6,0	5,9	-	-	
Média	30,4	31,3	6,6	6,6	-	-	6,66	6,16	6,2	6,1	-	-	
30 DPI													
16	28,6	29,2	6,4	6,5	-	-	5,9	5,5	5,9	5,9	-	-	
17	30,1	32,4	6,6	6,5	-	-	5,9	5,9	5,9	5,9	-	-	
18	34,6	35,6	6,4	6,6	-	-	6,7	5,0	5,9	5,8	-	-	
Média	31,1	32,4	6,5	6,5	-	-	6,16	5,26	5,9	5,9	-	-	
Controles*	18°C		6,55				1,5°C		5,36				

HPI - Horas após-infecção

LD - Longissimus dorsi

*Ovinos Corriedale sadios abatidos no Frigorífico Alegretense

DPI - Dias após-infecção

SM - Semimembranosus

*Título - Log₁₀/ml em cultivo celular

- = negativo

com pH inicial próximo a 6,9, houve declínio após a maturação para valores que atingiram 5,22 a 5,31.

DISCUSSÃO

A literatura registra que em relação aos bovinos, o pH inicial da carne após o abate é de 7,2 declinando uma hora mais tarde para 6,5-6,8 (20,32). Quando o músculo está em rigor mortis, o pH pode variar de 5,4 a 6,0 (15). O nível de pH alcançado pela carne de bovinos sadios depende do mínimo de dois fatores: a) o conteúdo de glicogênio do músculo no momento do sacrifício e, b) a capacidade buffer do músculo (4,15). Segundo os mesmos autores nas carnes maturadas de animais sadios, o pH mais baixo encontrado foi de 5,3. No entanto se a atividade do animal foi severa e prolongada antes do abate o pH pode atingir até 7,0. Algumas enfermidades também podem influenciar no processo e inibir a formação do ácido láctico, resultando em leituras altas de pH (4). O pH da carne de ovinos e suínos raramente é inferior a 5,7 após a maturação, provavelmente devido a que essas carnes contêm menos glicogênio (15).

A inativação do vírus da febre aftosa nos músculos de uma carcaça dependem portanto das trocas químicas ocorridas durante o processo de maturação, no qual o primeiro fator considerado é a produção de ácido láctico (10). Sobrevivência do vírus pode ocorrer se o pH da carne não atinge valores inferiores a 6,2 durante o processo de maturação. Inclusive o vírus poderá permanecer na carne por vários meses se a acidificação for interrompida para congelamento da carcaça (13).

No presente trabalho a inoculação de uma dose infectante de $10^{5,6}$ /ml da suspensão do vírus O_1 Campos por via IDL nos ovinos em experimento, pode ser considerada alta para produzir a infecção, ainda mais com o vírus adaptado à espécie com seis passagens. No entanto, foi utilizada de maneira proposital a fim de assegurar uma adequada distribuição de vírus por todo o organismo do animal, através de uma severa infecção. Assim, o sacrifício dos ovinos às 48, 72, 96 e 120 HPI foi o

Quadro 4. Supervivência do vírus tipo O_1 da febre aftosa em músculos de ovinos infectados experimentalmente. Títulos após maturação das carcaças e congelamento por 120 dias

HPI/nº	Após maturação		Congelados após maturação*	
	LD	SM	LD	SM
48				
1**	4,16	1,60	2,32	-
2	1,70	1,60	-	-
3	4,66	1,76	3,00	-
72				
4	2,68	3,71	-	-
5	1,62	-	1,85	1,85
6	-	-	1,75	-
96				
7	-	-	1,65	2,49
8	-	0,87	-	-
9	-	-	-	-
120				
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-

*Congelados a -20°C na câmara de congelamento.

Amostra retirada na hora de processar

** Log_{10} /ml em cultivos de células IB-RS₂.

LD - Longissimus dorsi

SM - Semimembranosus

tempo considerado mais próximo do pico de replicação de vírus e viremia. Em ovinos o período de incubação em seguida à infecção experimental pode ser de 18 horas (12).

As temperaturas elevadas verificadas às 24 e 48 HPI coincidem com os títulos de viremia. Esses parâmetros indicativos de infecção, principalmente a ocorrência de viremia, em ovinos, tem levado muitos investigadores a detectar infecção subclínica na ausência de lesões (2,19). Vários investigadores demonstraram viremia numa alta percentagem de ovinos infectados experimentalmente, após a infecção por inoculação (2,6,19). Essa viremia ocorre geralmente entre 24 e 48 HPI, estando nossos resultados em concordância com esses autores. Neste experimento no entanto, às 72 HPI os títulos virêmicos foram bastante baixos e às 96

HPI negativos na totalidade dos animais. Esta fugacidade da viremia em ovinos poderia estar relacionada com o início da formação de anticorpos neutralizantes detectada por alguns investigadores às 60 HPI (11) às 96 HPI (6) e entre 96-144 HPI (27) após infecção.

Todos os animais inoculados apresentaram lesões linguais. Naqueles sacrificados após 48 HPI foram observadas lesões de generalização em uma ou mais patas. Esses resultados estão de acordo com trabalhos de adaptação de vírus a ovinos em que após a 6ª passagem a generalização foi de 97% (2).

Conforme mostrado no quadro 2 houve uma infecção generalizada nos ovinos em experimento, com distribuição de vírus em todos os órgãos e gânglios pesquisados. Os títulos mais elevados foram encontrados nos rins. Segundo observações de outro autor (34) em suínos, o baço oferece menos proteção ao vírus, enquanto os rins aparentemente favoreceriam sua sobrevivência. Os resultados deste experimento indicaram a mesma tendência em ovinos. Nas amígdalas e gânglios os títulos de vírus também foram elevados. Embora próximo aos músculos os linfonodos não desenvolvem o grau de acidez presente no tecido muscular (13). O isolamento de vírus nos órgãos e gânglios só foi possível nos ovinos sacrificados até às 120 HPI. Naqueles sacrificados aos 15 e 30 DPI os resultados foram negativos, provavelmente devido a diminuição da concentração de vírus nos fluidos e tecidos do animal em função do processo de síntese de anticorpos. A propósito, trabalhos de outros autores indicam que o pico de títulos neutralizantes em ovinos foram encontrados aos 7 DPI (6), 10 DPI (11) e 12-18 DPI (27).

O pH dos músculos LD e SM após maturação das carcaças dos ovinos abatidos até às 96 HPI, com raríssimas exceções atingiram valores de pH inferiores a 6,0, chegando em algumas vezes a alcançar valores de 6,9. Estes resultados não foram surpreendentes se considerarmos o estresse a que esses animais foram submetidos, traduzido por estado febril elevado após inoculação do vírus de febre aftosa, sangrias diárias, exame clínicos, etc. Segundo Bate-Smith (4) algumas condições patológicas podem influir na formação de ácido

lático dando como resultado leituras elevadas de pH. Com algumas exceções, as leituras mais próximas ou abaixo de 6,0 só foram registradas nos ovinos abatidos a partir de 120 HPI, quando não havia mais viremia e aos 15 e 30 DPI quando os animais já estavam em plena recuperação. Chama atenção que nos animais abatidos às 48 HPI os títulos de vírus detectados nos músculos LD e SM tenham sido baixos antes da maturação e mais altos após, mesmo com pH inferior. Provavelmente a distribuição de vírus na carcaça dos animais não ocorra de maneira uniforme, proporcionando resultados diversos em diferentes amostras. Aliás, Correa e Urrestarazú (9) registram que na medição de pH em músculos de carcaças deve ter-se em conta que as distintas temperaturas observadas na superfície e profundidade do tecido influem na intensidade das reações enzimáticas alterando as leituras. Poderá também haver variações no mesmo músculo de acordo com a profundidade da colheita da amostra. Por outro lado as leituras de pH devem estas associadas à temperatura das carcaças antes e após maturação. No presente experimento a média das temperaturas nos músculos LD e SM dos ovinos infectados estavam em torno de 29°C antes da maturação e 6,8°C após. Nos ovinos sadios da mesma raça abatidos no frigorífico esses valores foram de 18°C e 1,5°C respectivamente.

A resposta que o animal apresenta aos fatores considerados estressantes antes do abate, depende da espécie, idade, sexo, resistência e o estado emocional. Dos fatores ambientais, a temperatura está relacionada como um dos principais. Temperaturas elevadas, podem elevar a temperatura muscular, acelerando as reações metabólicas. Nestes casos os animais, para manter a temperatura e as condições musculares em níveis normais, utilizam as suas reservas energéticas, apresentando deficiência de glicogênio e uma glicólise post-mortem lenta com limitada produção de ácido lático (28,31).

Ficou demonstrado neste experimento que nos animais abatidos em estado febril o pH não atingiu valores inferiores a 6,0 na maturação e portanto não houve inativação do vírus nas carcaças. O imediato congelamento dessas carcaças a -20°C permitiu a permanência do vírus nos músculos LD

e SM detectado em amostras colhidas quatro meses após o congelamento. Henderson & Broosky (13) também registraram a sobrevivência do vírus aftoso em carnes de bovino congeladas a -20°C e observaram que embora essa temperatura seja inferior a de -10°C , normalmente utilizada nos frigoríficos, a diferença não foi importante na sobrevivência do vírus. A despeito da redução nos títulos de vírus nos músculos LD e SM após congelamento, houve também algumas discrepâncias. Em alguns animais nos quais não havia sido detectado vírus após a maturação, o vírus foi isolado após o congelamento. Como citado anteriormente a distribuição não uniforme do vírus na carcaça e as variações no mesmo músculo de acordo com a profundidade da colheita da amostra (9) poderiam provavelmente explicar o fato.

Por outro lado nos ovinos abatidos às 120 HPI, 15 e 30 DPI não foi detectado vírus nos músculos antes ou após a maturação. Provavelmente a rápida formação de anticorpos já a partir das 60 HPI como observado (11) diminuiria sensivelmente a circulação do vírus. Este fato indica que em animais convalescentes da infecção, portanto com altos níveis de anticorpos não haveria possibilidade da sobrevivência do vírus no tecido muscular.

Nas observações de pH em carcaças de ovinos sadios, da mesma raça e idade dos utilizados no presente experimento, sacrificados em abate realizado no Frigorífico Alegretense, o pH registrado foi de 5,96 após seis horas e 5,36 após 24 horas de maturação. Esses valores estão em concordância com os dados de Solomon et al. (29) nos estudos em carcaças de ovinos sadios. Estas leituras indicam que o abate dos ovinos nos meses de verão não teve influência na queda do pH após maturação.

É fato reconhecido que em ovinos a febre aftosa é menos aparente que nos bovinos e que as lesões passam despercebidas com frequência. Em estudos de adaptação do vírus aftoso em ovinos como descrito (2) foi verificado que lesões podais só foram registradas após a 3ª ou 4ª passagem. Dessa observação deduz-se que a nível de campo quando se observam ovinos com claudicação devido à febre aftosa, o vírus já deve estar circulando por algum tempo.

Enfatiza-se portanto a importância do conhecimento epidemiológico a partir da microcaracterização da região de origem dos animais que vão ao abate, bem como a necessidade de se realizar o exame ante-mortem com maior rigor, a fim de evitar que inadvertidamente animais enfermos possam ser abatidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Vicente Astudillo, Diretor do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, o incentivo e apoio ao desenvolvimento deste trabalho, ao Dr. Joal José Brazzale Leal, Chefe do CPPSUL, EMBRAPA, Bagé, RS e equipe a doação dos animais utilizados no experimento e as facilidades proporcionadas, e aos Srs. Oswaldo Guerra Júnior e Alceu de Macedo Domele, respectivamente Gerente do Frigorífico e Presidente da Cooperativa de Alegrete, RS por sua cooperação.

REFERÊNCIAS

1. AALHUS, J.L., PRICE, M.A. Endurance-exercised growing sheep: 1. Post-mortem and histological changes in skeletal muscles. *Meat Science*, 29: 43-56, 1991.
2. ALONSO FERNÁNDEZ, A., FERNANDES, M.V. Experimental inoculation of sheep with foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.*, 73: 507-520, 1970.
3. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 25-34, 1976.
4. BATE-SMITH, E.C. The physiology and chemistry of rigor mortis with special reference to the aging of beef. *Advances in Food Res.*, 1:1-38, 1948.
5. BOWLING, R.A., SMITH, G.C., DUTSON, T.R., CARPENTER, Z.L. Effects of prerigor conditioning treatments on muscle shortening, pH and ATP. *J. Food Sci.*, 43:501-507, 1978.
6. BURROWS, R. The persistence of foot-and-mouth disease in sheep. *J. Hyg.*, 66:633-640, 1968.
7. COIMBRA, A.F. Sinopse do setor agropecuário gaúcho frente ao Mercosul: ovinos situação

- preliminar. Em: Rio Grande do Sul, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1992.
8. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Import conditions for sheep meat from countries affected with and/or vaccinating against foot-and-mouth disease (FMD) and on the possible ways of reducing this risk to an acceptable level. Report of the Scientific Veterinary Committee (Animal Health), 1993.
 9. CORREA, C.A., URRESTARAZÚ, V. Aplicación de la tecnología de la carne en la inactivación del virus de la fiebre aftosa y demás aspectos higiénicos sanitarios. En: *V Congreso Latino Americano de Buiatría. XII Jornadas Uruguayas de Buiatría*, Paysandú, Uruguay, 13-15 de junio de 1984.
 10. COTTRAL, G.E., COX, B.F., BALDWIN, D.E. The survival of foot-and-mouth disease virus in cured and uncured meat. *Am. J. Vet. Res.*, 3:288-297, 1960.
 11. DELLERS, R.W., HYDE, J.L. Response of sheep to experimental infection with foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.*, 25:469-473, 1964.
 12. GEERING, W.A. Foot-and-mouth disease in sheep. *Aust. Vet. J.*, 43:485-489, 1967.
 13. HENDERSON, W.M., BROOKSBY, J.B. The survival of foot-and-mouth disease virus in meat and offal. *J. Hyg.*, 46, (4):394-402, 1948.
 14. JAIME, I., BELTRAN, J.A., CEÑA, P., LORENZO, L.P., RONCALÉS, P. Tenderization of lamb meat: effect of rapid postmortem temperature drop on muscle conditioning and aging. *Meat Science*, 32:357-366, 1992.
 15. JENSEN, L.B. *Meat and meat foods*. New York, N.Y., Ronald Press Co., 1949.
 16. KOOHMARIE, M., WHIPPLE, G., KRETCHMAN, D.J., CROUSE, J.D., MERSMAN, H.J. Postmortem proteolysis in longissimus muscles from beef, lamb, pork carcasses. *J. Anim. Sci.*, 9:617-624, 1991.
 17. KORKEALA, H. Determination of pH in meat. *Meat Science*, 18:121-132, 1986.
 18. LUNDBERG, P., VOGEL, H.J. Post-mortem metabolism in fresh porcine, ovine and frozen bovine muscle. *Meat Science*, 19:1-14, 1987.
 19. McVICAR, J.W., SUTMOLLER, P. Experimental foot-and-mouth disease in sheep and goats: An epizootiological model. *Arch. ges. Virusforsch.*, 38:85-96, 1972.
 20. MILLER, A.R. *Meat hygiene*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1958.
 21. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Reglamentación recomendada para los intercambios de animales y productos animales. Paris, OIE, 1986. 5ª ed.
 22. PAY, T.W.F. Foot-and-mouth disease in sheep and goats: a review. *FMD Bull.*, 26 (3), 1988.
 23. PEREIRA DE CASTRO, M. Clonal variation in the swine kidney cell line, IB-RS₂, in relation to morphology, karyotype and susceptibility to FMDV. *Arch. Inst. Biol. São Paulo*, 37 (2):103-127, 1970.
 24. PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza, Acribia, 1976. p. 668.
 25. RILEY, M.L., BOTKIN, M.P., FIELD, R.A., RAFLOFF, H.A., WIENLAND, D.A. Effect physical form of the diet and stress on carcass characteristics of lamb. *J. Anim. Sci.*, 53:1489-1495, 1981.
 26. ROÇA, R.O., SERRANO, A.M. Abate de bovinos: Conversão de músculo em carne. *Higiene Alimentar*, 8 (33):7-13, 1994.
 27. SHARMA, S.K. Studies on foot-and-mouth disease in sheep with special reference to distribution of the virus and carrier status. *Vet. Res. Bull.*, 1 (2):156-157, 1978.
 28. SHORTOSE, W.R. Effects of level of feeding, pre-slaughter stress and method of slaughter on postmortem glycolysis of sheep muscles. *Meat Science*, 2:189, 1978.
 29. SOLOMON, M.B., LYNCH, G.P., BEREY, B.W. Influence of animal diet and carcass electrical stimulation on the quality of meat from youthful ram lambs. *J. Anim. Sci.*, 62:139-146, 1986.
 30. STILES, W. The preservation of food by freezing with special reference to fish and meat: a study in general physiology. *Dept. Sci. & Ind. Res. Special Rep.*, 7:170-173, 1922.
 31. TARRANT, P.V., SHERINGTON, J. An investigation of ultimate pH in muscles of commercial beef carcasses. *Meat Science*, 4:87-297, 1980.
 32. THORTON, H. *Textbook of meat inspection*. London. Bailliere, Tindall & Cox, 1957.
 33. WHITING, R.C., STRANGE, E.D., MILLER, A.J., BENEDICT, R.C., MOZERSKY, S.M., SWITH, C.E. Effects of electrical stimulation on the functional properties of lamb muscle. *J. Food Sci.*, 46:484-490, 1981.
 34. WITTMAN, G. Die Tenazität des MKS - Virus in virus kaltigen shweinegeweben. *Mowatch. f. Tierheilk.*, 9:215-230, 1957.

ABSTRACT

Survival of foot-and-mouth disease virus O_1 in carcasses of experimentally infected sheep, before and after the maturation process

The survival of foot-and-mouth disease virus type O strain O_1 Campos was studied in carcasses of experimentally infected sheep. In sheep slaughtered in febrile state at 48, 72 and 96 hours post-infection (HPI) the virus was detected before and after maturation of carcasses in the muscles Longissimus dorsi (LD) and Semimembranosus (SM), that did not reach a pH inferior to 6.0 during the maturation process. No virus was detected before or after maturation of carcasses in those sheep slaughtered at 120 HPI, 15 to 30 days post-

infection (DPI). In those carcasses of which muscles LD and SM still presented virus after maturation and that were frozen at -20°C , virus could be isolated when samples of these muscles were processed four months after freezing. Virus was detected in glands and organs of slaughtered sheep at 48, 72, 96 and 120 HPI. Kidneys presented titers varying from $10^{3.0}$ to $10^{3.7}$ ID_{50} . In the pre-escapulars glands, submaxilaris and tonsils, titers varied from $10^{1.8}$ to $10^{4.9}$ ID_{50} . Virus was not detected in any organ or gland studied in sheep slaughtered at 15 and 30 DPI. In healthy sheep of the same race and age of those utilized in the experiment and slaughtered simultaneously in the summer months, the pH of the carcasses reached values of 5.96 after 6 hours and 5.36 after 24 hours of maturation. The epidemiological knowledge of the region of origin of the sheep to be slaughtered and the ante-mortem inspection are emphasized.

RESUMEN

Supervivencia del virus de la fiebre aftosa tipo O_1 en carcasas de ovinos infectados experimentalmente, antes y después del proceso de maduración

Se estudió la supervivencia del virus de la fiebre aftosa tipo O cepa O_1 Campos en carcasas de ovinos infectados experimentalmente. En los ovinos sacrificados en estado febril a las 48, 72 y 96 horas posinfección (HPI) se encontró virus antes y después de la maduración de las carcasas en los músculos Longissimus dorsi (LD) y Semimembranosus (SM), los cuales no alcanzaron un pH inferior a 6.0 durante la maduración. En los ovinos sacrificados a las 120 HPI, y a los 15 y 30 días posinfección (DPI) no se encontró virus antes o después de la maduración de las carcasas. En las carcasas

congeladas a -20°C , cuyos músculos LD y SM aún contenían virus después de la maduración, se aisló virus cuando las muestras de esos músculos fueron examinadas cuatro meses después del congelamiento. Se encontró virus en los órganos y ganglios de los ovinos sacrificados a las 48, 72, 96 y 120 HPI. En los órganos, los riñones presentaron títulos de virus que variaron de $10^{3.0}$ a $10^{3.7}$ DI_{50} . En los ganglios preescapulares, submaxilares y amígdalas, los títulos variaron de $10^{1.8}$ a $10^{4.9}$ DI_{50} . En los ovinos sacrificados a los 15 y 30 DPI no se encontró virus en ninguno de los órganos o ganglios estudiados. En ovinos sanos de la misma raza y edad de los estudiados en el experimento y sacrificados simultáneamente en los meses de la realización del estudio (verano), el pH de las carcasas alcanzó valores de 5.96 después de 6 horas y 5.36 después de 24 horas de maduración. Se da énfasis a la importancia del conocimiento epidemiológico de la región de origen de los ovinos destinados a faena y al rigor del examen ante-mortem.