

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE SETE SURTOS DELÍNGUA AZUL
EM OVINOS EM 2014 NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

LORENA LIMA BARBOSA GUIMARÃES

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE SETE SURTOS DE LÍNGUA AZUL
EM OVINOS EM 2014 NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

LORENA LIMA BARBOSA GUIMARÃES

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de mestre em
Ciências Veterinárias na área de
concentração em Cirurgia, Morfologia e
Patologia Animal da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Lima Barbosa Guimarães, Lorena

Achados clínicos e patológicos de sete surtos de língua azul em ovinos em 2014 no Rio Grande do Sul, Brasil / Lorena Lima Barbosa Guimarães. -- 2015.
64 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. ovinocultura. 2. pneumonia aspirativa. 3. necrose muscular. 4. esôfago. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

LORENA LIMA BARBOSA GUIMARÃES

**ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE SETE SURTOS DE LÍNGUA
AZUL EM OVINOS EM 2014 NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Aprovado em 26 de fevereiro de 2015.

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Aldo Gava (UDESC, Lages)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros (professor aposentado UFSM, Bolsista
Fundect UFMS)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini (UFRGS, Porto Alegre)

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Creio que Deus é a essência da Vida. Portanto, é a Ele quem tenho que agradecer primeiramente. Sou grata por ter nascido e crescido em uma família que é o pilar dos meus sonhos e a luz que clareia os mais sombrios dos meus dias.

A nós foi dado o livre arbítrio, sendo assim, também agradeço aos meus pais pela escolha de me amar incondicionalmente. Sou grata pelo carinho e pelas broncas, pela dedicação exclusiva que deram a cada filha e acima de tudo, por cuidarem das feridas que esse mundo muitas vezes nos causa.

Depois de muito tempo, hoje eu sei, meus passos e os da minha irmã sempre estarão firmes e no caminho certo, pois em terra minha mãe estará sempre ao nosso lado e meu pai nos guia através do “outro lado”.

ÀIara, minha irmã, eu agradeço pela companhia, que mesmomuitas vezes silenciosa, sempre será a melhor.

Sou grata aos meus avós por serem tão bondosos como meus pais e por serem melhores não me dando broncas. As minhas tias por serem minhas mães e amigas. Aos meus tios por estarem na torcida da minha vida. Aos meus primos por terem sido verdadeiros irmãos, sendo malvados e me defendendo do mundo.

Não posso deixar de agradecer aos meus totós, Lua e pandora, que sempre estiveram comigo na alegria e na tristeza, na saúde e na doença.

E aos meus amigos Bárbara, Carolina Lira, Cíntia, Danilo, Fabi Boabaid, Juliana Carvalho, Kívia, Lauren, Matheus Reis, Raquel Aparecida, Raquel e Sarah. E também ao meu namorado Alexandre.

Ainda tenho na lembrança os meus professores da UFG e agradeço por seu ensino. Sou grata, principalmente, ao Professor Percílio Brasil que me ajudou tanto no período de estágio obrigatório.

Aos meus colegas do SPV-UFRGS e professores Saulo Pavarini e Luciana Sonne, obrigada pela ajuda nos trabalhos e na rotina.

Por fim, obrigada ao Professor David Driemeier pela oportunidade de estar no SPV-UFRGS, que nos oferece prática da patologia veterinária, amplia nossa visão como veterinários e nos estimula a crescer, tanto profissional como pessoal. Embora seja meu professor e meu chefe eu o tenho com muito carinho.

EPÍGRAFE

“É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DE SETE SURTOS DE LÍNGUA AZUL EM OVINOS EM 2014 NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

A infecção pelo Vírus da Língua Azul (VLA) ocorre em ruminantes domésticos e selvagens, preferencialmente, ovinos, bovinos e caprinos em regiões tropicais e temperadas onde há o vetor, mosquito do gênero *Culicoides*. O objetivo do trabalho é descrever os aspectos clínicos e anatomopatológicos de sete surtos de infecção pelo VLA em ovinos no Rio Grande do Sul, confirmados pelo isolamento viral e teste da RT-PCR. De janeiro a outubro de 2014 foram diagnosticados sete surtos de infecção pelo VLA em ovinos no estado do Rio Grande do Sul com histórico de mortalidade de ovinos nos municípios de Taquara (Propriedade A), Fazenda Vilanova (Propriedade B), Viamão (Propriedades C e F), Cachoeira do Sul (Propriedade D e E) e Venâncio Aires (Propriedade G). Os achados clínicos relacionavam-se com o sistema respiratório e locomotor. A taxa de mortalidade variou de 1,7 (4/230 ovinos) a 56% (28/50 ovinos). Realizou-se a necropsia de 10 ovinos e de um feto abortado por um dos ovinos submetidos à necropsia. As principais alterações observadas nos ovinos foram: hiperemia e conteúdo alimentar na cavidade nasal (7/10), pulmões aumentados de tamanho com intenso edema (6/10), consolidação pulmonar antero-ventral (5/10), hemorragias no coração (5/10), hemorragia da artéria pulmonar (4/10) e discreta dilatação e flacidez do esôfago (4/10). Os achados histológicos caracterizaram pneumonia aspirativa (3/10), rinite purulenta (1/10), necrose muscular do esôfago (8/10), hemorragias no coração (3/10), necrose de cardiomiócitos (2/10) e necrose do músculo serrátil cervical ventral (8/10). O feto não apresentou alterações macroscópicas e histológicas. Para confirmar a suspeita foram coletadas 20 amostras de sangue de ovinos doentes e recuperados, e de um bovino. A partir do teste da RT-PCR e isolamento viral confirmou-se o diagnóstico de infecção pelo vírus da língua azul nos sete surtos ocorridos em 2014 no Rio Grande do Sul. E, pela análise filogenética comprovou-se a participação do sorotipo 4 nas Propriedades D e B.

Palavras-chave: ovinocultura, pneumonia aspirativa, necrose muscular, esôfago.

ABSTRACT

CLINICAL AND PATHOLOGICAL FINDINGS OF SEVEN OUTBREAK OF BLUETONGUE IN SHEEP DURING 2014 IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

The infection by Bluetongue Virus (BTV) occurs in domestic and wild ruminants, including sheep, cattle and goats in the tropical and temperate regions where the vector is present *Culicoides*. The objective is describe the clinical and pathological aspects of seven outbreaks of infection by BTV in Rio Grande do Sul, confirmed by viral isolation and RT-PCR test. From January to October 2014 were diagnosed seven outbreaks of infection by BTV in sheep in the state of Rio Grande do Sul with a history of sheep mortality in the cities of Taquara (Propriedade A), Fazenda Vilanova (Propriedade B), Viamão (Propriedade C and F), Cachoeira do Sul (Propriedade D and E) and Venâncio Aires (Propriedade G). Clinical findings were related to the respiratory and locomotor system. The sheep mortality ranged from 1.7 to 56%. At necropsy the main changes observed in sheep were hyperemia and food content in the nasal cavity (7/10), increased lung size with marked edema (6/10), anterior-ventral pulmonary consolidation (5/10), bleeding heart (5 / 10), bleeding from the pulmonary artery (4/10) and mild swelling and sagging of the esophagus (4/10). Histological findings included aspiration pneumonia (3/10), purulent rhinitis (1/10), muscle necrosis of the esophagus (8/10), bleeding heart (3/10), cardiomyocyte necrosis (2/10) and cervical ventral serratus muscle necrosis (8/10). The fetus showed no macroscopic and histological changes. To confirm the suspicion were collected 20 blood samples from sick and recovered and sheep, and one cow. The RT-PCR test and virus isolation confirmed infection with bluetongue. For phylogenetic analysis of the virus serotype 4 was identified in the Propriedade B and D.

Keywords: ovine culture, aspiration pneumonia, muscle necrosis, esophagus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Aprisco localizado as margens de uma lagoa. 52
- Figura 2:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Ovino com secreção nasal mucosa de coloração esverdeada. 52
- Figura 3:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Secreção nasal mucosa e de coloração esverdeada. 53
- Figura 4:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Secreção nasal catarral e aumento de volume da face. 53
- Figura 5:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Mucosa oral cianótica. 54
- Figura 6:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Material vegetal no interior de brônquios. 54
- Figura 7:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Infiltrado multifocal acentuado de macrófagos associado à necrose multifocal acentuada de miofibras, caracterizada por fibras marcadamente eosinofílicas, hipercontraídas e com perda de estriações. HE, obj.20x. 55
- Figura 8:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Esôfago com infiltrado acentuado de macrófagos em atividade fagocítica associado à necrose e fragmentação de miofibras. HE, obj.40x. 55
- Figura 9:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Músculo serrátil cervical ventral com infiltrado acentuado de macrófagos associado a intensa proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, além de áreas multifocais de mineralização, HE, obj.20x..... 56
- Figura 10:** Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Músculo serrátil cervical ventral. Mineralização, degeneração flocular e fragmentação de fibras musculares. HE, obj.40x. 56

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Histórico	12
1.2 Etiologia	14
1.3 Epidemiologia	17
1.4 Patogenia	19
1.5 Sinais clínicos.....	22
1.6 Lesões macroscópicas	24
1.7 Lesões microscópicas	25
1.8 Diagnóstico.....	26
1.9 Diagnóstico diferencial.....	28
1.10 Controle e profilaxia.....	29
2. ARTIGO	32
3. FIGURAS ADICIONAIS	52
4. DISCUSSÃO GERAL	57
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

INTRODUÇÃO

O Vírus da Língua Azul (VLA) é membro da família Reoviridae e gênero *Orbivirus* (OSBURN, 1994; COSTA et al., 2006; ORTEGO & MERTENS, 2014), não é encapsulado e apresenta capsídeo icosaédrico (MOHL & ROY, 2014).

O VLA apresenta 26 sorotipos identificados (MAAN et al., 2012; ORTEGO & MERTENS, 2014) e há estudos comprovando a existência de mais três sorotipos distintos (WRIGHT, 2014; ZIENTARA et al., 2014; MAAN et al., 2015).

Essa enfermidade viral está restrita às regiões tropicais e temperadas (GIBBS & GREINER, 1994). Isso se deve à presença e adaptação do vetor, mosquitos do gênero *Culicoides*, em diferentes regiões do mundo (GIBBS & GREINER 1994; MACLACHLAN et al., 2009).

A infecção pelo VLA é uma doença reemergente sustentada pelo complexo hospedeiro, vetor e patógeno (ORTEGO & MERTENS, 2014). Atualmente a enfermidade está listada pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) como doença com perigos específicos e de declaração obrigatória (OIE, 2015).

A enfermidade afeta ovinos, bovinos e diversas espécies de ruminantes selvagens, (RIET-CORREA et al., 1996). Dentre as espécies domésticas, os ovinos apresentam maior sensibilidade à doença e a manifestação clínica varia de acordo com a raça, idade e *status* imunológico dos ovinos afetados (BROWN et al., 2007; WORWA et al., 2008).

A doença pode causar a morte de ovinos, enquanto que a infecção em bovinos e caprinos, geralmente, é subclínica, tornando estas espécies importantes reservatórios do vírus (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE, 2000).

A principal causa da enfermidade é decorrente da capacidade que o vírus tem de replicar e destruir células endoteliais em diferentes órgãos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; ALFIERI, 2007; ZACHARY, 2012), culminando em vasculite e morte endotelial (ZACHARY, 2012).

O presente trabalho descreve os aspectos clínicos e anatomopatológicos de sete surtos de infecção pelo VLA em ovinos e comprova a presença do sorotipo 4 em dois destes surtos no Rio Grande do Sul, confirmados pelo isolamento viral e teste da RT-PCR.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

A infecção pelo Vírus da Língua Azul (VLA) foi identificada pela primeira vez no continente africano. No final do século XVIII, a doença foi observada em ovinos, caprinos, bovinos e em ruminantes silvestres. A enfermidade foi confirmada na África do Sul no século XX por Gorman (GIBBS & GREINER, 1994; ROY, 2007). Clinicamente os ovinos apresentavam a língua enegrecida ou azulada, compreendendo o sinal clínico característico da doença (ROY, 2007).

A primeira descrição da infecção pelo VLA foi em 1902 no Jornal Agrícola da Colônia do Cabo e a primeira publicação detalhada foi em 1905. A doença recebeu a nomenclatura inicial de “*Malarial Catarrhal Fever*” ou febre catarral malárica pelo *The Colonial Veterinary Surgeon*. Contudo esse termo “malária” tornou-se inadequado, pois desde 1901 havia sido comprovada a transmissão da doença através da inoculação do soro de animais doentes em animais sadios, demonstrando que o agente infeccioso não estava vinculado às hemácias (SPREULL, 1905).

Em 1924 ocorreu o primeiro caso confirmado de infecção pelo VLA próximo à Europa, em Cyprus. Em seguida ocorreram vários surtos entre 1943-1944, quando a mortalidade atingiu 70% do rebanho europeu. Nos Estados Unidos da América, a infecção pelo VLA em ovinos foi documentada pela primeira vez em 1948 (ROY, 2007).

Um primeiro experimento conduzido entre 1942-1943 confirmou pela primeira vez a transmissão mecânica da doença por insetos vetores do gênero *Culicoides* (DU TOIT, 1944).

O primeiro relato de infecção pelo VLA em animais da América do Sul foi em 1980 a partir do isolamento do sorotipo 4 em bovinos oriundos do Brasil e que estavam em quarentena na Florida, Estados Unidos da América (GROOCOCK & CAMPBELL, 1982). Apenas em 2001 foi confirmado o primeiro surto da doença em ovinos e caprinos no Paraná, Brasil, onde foi isolado o sorotipo 12 (CLAVIJO et al., 2002).

A doença surgiu no Brasil em decorrência da importação de animais de raça leiteira contaminados pelo vírus. As pesquisas com levantamento sorológico realizado em pequenos ruminantes no país demonstram resultados alarmantes (Tabela 1) (PINHEIRO et al., 2003).

Tabela 1 - Levantamentos sobre a soroprevalência da infecção pelo VLA em pequenos ruminantes no Brasil.

Espécie	Soropositivos (%)	N° de amostras	Região	Autores
caprina	14,9	NI	RJ	Abreu et al. (1984)
caprina	5,9	340	MG	Silva et al. (1988)
caprina	44,1	593	RJ	Cunha et al. (1988)
ovina	24,2	33	RJ	Cunha et al. (1988)
caprina	1,5	76	Nordeste	Brown et al. (1989)
ovina	52,7	72	SP	Arita et al. (1992)
ovina	0,15	1341	RS	Costa (2000)
caprina	42,3	1484	MG	Lobato et al. (2001)
ovina	13,61	181	CE	Frota et al. (2001)
caprina	30,6	1865	CE	Silva (2002)
NI - Não Informado. Adaptado de Pinheiro et al., 2003.				

Em 1963 a infecção pelo VLA passou a compor a lista do Código Zoosanitário Internacional do Gabinete Internacional de Epizootias da *Food and Agricultural Organization of the United Nations* como uma das 15 doenças que ameaçam a economia regional, ocupando um lugar importante na história dos vírus emergentes (GIBBS & GREINER, 1994).

Atualmente a infecção pelo VLA está listada na *World Organisation for Animal Health* (OIE). As resoluções aprovadas pelo Comitê Internacional e as recomendações emitidas pelas Comissões Regionais instruem a sede da OIE a estabelecer uma única lista das doenças dos animais terrestres e aquáticos. Frente aos Acordos e Negociações Comerciais da Organização Mundial do Comércio (OCM) as doenças são classificadas quanto aos perigos específicos e de declaração obrigatória, dando a todas as enfermidades listadas o mesmo grau de importância internacional (OIE, 2015).

A infecção pelo VLA tem sido conhecida pelos criadores de ovino sul-africanos desde os primeiros anos do século XIX. A partir desta dada mais de 2000 artigos foram publicados sobre o vírus e cerca de 800 deles têm aparecido nos últimos 10 anos (ORTEGO & MERTENS, 2014).

1.2 Etiologia

O VLA é membro da família Reoviridae, gênero *Orbivirus* (OSBURN, 1994; COSTA et al., 2006; ORTEGO & MERTENS, 2014).

A família Reoviridae é composta por 11 gêneros (ALFIERI 2007; ROY 2007) dos quais apenas cinco infectam vertebrados (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* e *Aquareovirus*). Destes apenas os gêneros *Orbivirus* e *Rotavirus* ocasionam infecções que, devido suas características epidemiológicas e pela gravidade dos sinais clínicos, são consideradas importantes em mamíferos (ALFIERI, 2007).

Esses vírus podem ser distinguidos e identificados por diferentes características, incluindo capsídeo e número, tamanho e distribuição dos segmentos do genoma, além da gama de hospedeiros, propriedades sorológicas e composição das proteínas (MERTENS et al., 2004).

Apesar da similaridade básica entre os membros da família Reoviridae, os *Orbivirus* diferem na estrutura, nas propriedades físico-químicas, no ciclo de replicação, na patogênese e na epidemiologia. Ao contrário dos demais membros desta família, os *Orbivirus* são, primariamente, transmitidos por vetores artrópodes, como mosquitos e carrapatos (ALFIERI, 2007; ROY, 2007).

O grupo dos *Orbivirus* é composto pelo vírus da língua azul, vírus da peste equina, vírus da encefalite equina, vírus da doença epizootica hemorrágica dos cervos, vírus Ibaraki e vírus Palyam. Os *Orbivirus* infectam uma variedade de vertebrados, incluindo ruminantes domésticos e selvagens, equídeos, roedores, morcegos, primatas, marsupiais e aves (ALFIERI, 2007).

Os vírus pertencentes a esse gênero são de cadeia dupla de RNA (OSBURN, 1994). Eles medem entre 60 e 85nm de diâmetro, não apresentam envelope lipídico, e as proteínas estruturais estão dispostas em camadas concêntricas que, geralmente, conferem uma simetria icosaédrica. Os vírus são resistentes a solventes lipídicos, sensíveis aos desinfetantes à base de iodóforos e fenóis. São estáveis em pH entre 6,5 e 8,0 e à temperatura de 4°C, principalmente, em matéria orgânica. O congelamento reduz até 90% a infectividade viral (ALFIERI, 2007).

O genoma do VLA consiste de 10 segmentos de dsRNA, divididos em três segmentos grandes (L1 a L3), três médios (M4 a M6) e quatro pequenos (S7 a S10). O conjunto de segmentos genômicos codificam sete proteínas estruturais (Vp1 a VP7) e

três proteínas não estruturais (NS1 a NS3) (OSBURN, 1994; ALFIERI, 2007). O vírus não é encapsulado e apresenta capsídeo icosaédrico (MERTENS et al., 2004; MOHL & ROY, 2014).

O genoma do VLA pode ser separado em 10 classes de tamanho por eletroforese em gel de poliacrilamida e cada segmento do genoma codifica para uma proteína, gerando proteínas estruturais e não estruturais (MERTENS et al., 1984).

O VLA tem um capsídeo composto por três camadas distintas de proteínas. A camada mais interna é composta por VP3, a camada intermediária por VP7 e a camada mais externa do capsídeo é formado pela VP2 e VP5, codificadas pelos segmentos 2 e 6 do genoma (MERTENS et al., 2004).

O vírus mede 65 a 75nm de diâmetro. A camada interna ou núcleo contém cinco proteínas (VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7). Dentre estas, a VP7 (antígeno determinante do sorogrupo) e a VP3 são as mais abundantes. A VP3 forma uma estrutura central ou subnúcleo, no qual 260 trímeros da VP7 estão ancorados. Por isso exerce uma importante função na integridade estrutural do núcleo viral (ALFIERI, 2007).

A superfície externa do núcleo contém 780 cópias da proteína VP7 dispostas com 260 trímeros com simetria icosaédrica que interage com a VP3 formando grandes matrizes hexagonais (MERTENS et al., 2004).

O capsídeo mais interno é composto por 120 cópias da proteína VP3 (901 aminoácidos, pesando 103 kD) arrançadas em uma pseudosimetria icosaédrica, o que demonstra que a VP3 ocupa duas diferentes conformações, A e B, formada por moléculas idênticas. A VP3 determina a organização do genoma viral e dos componentes dos complexos de transcriptase (VP1, VP4 e VP6), que interagem com o genoma e que são altamente conservadas dentro dos diferentes gêneros da família Reoviridae. Comparando as sequências do segmento 3 do genoma e a proteína VP3 é possível distinguir as diferentes espécies dentro do gênero *Orbivirus* (MERTENS et al., 2004).

A VP7 é a proteína mais abundante que compõe o núcleo e também os principais determinantes antigênicos específicos de grupo. Apesar de fazer parte do núcleo, sabe-se que esta proteína está exposta em algumas regiões da superfície viral e é capaz de estimular a produção de anticorpos. Localizadas no interior do subnúcleo, as proteínas VP1, VP4 e VP6 estão presentes em pequenas quantidades e não desempenham um papel importante na estrutura do núcleo. A VP1 é a proteína com maior massa e, com

base em sua massa, localização, concentração molar no núcleo e sequencia de aminoácidos, acredita-se que seja a RNA polimerase viral. Essa proteína seria a responsável pela transcrição e replicação do genoma durante a replicação viral nas células hospedeiras (ALFIERI, 2007).

O núcleo icosaédrico do VLA é circundado pela camada externa ou capsídeo, que é composto por 360 trímeros de VP2 justapostos a 120 trímeros da proteína VP5, que podem ser visualizados através da microscopia crioeletrônica (MERTENS et al., 2004). Estas proteínas são as mais variáveis entre os diferentes sorotipos do vírus (MERTENS et al., 2004; ALFIERI, 2007).

A proteína VP2 contem epítomos neutralizantes que controlam a especificidade das interações entre a partícula viral e os anticorpos neutralizantes, determinando a identidade dos sorotipos, que pode ser reconhecida pela soroneutralização (MERTENS et al., 2004). A proteína VP2 é responsável pelo estímulo para a produção de anticorpos neutralizantes, apresenta atividade de hemaglutinação e hemadsorção (ALFIERI, 2007).

A VP5 possui 526 aminoácidos e tem função na penetração do vírus na membrana do endossomo, sendo responsável pela liberação do núcleo viral no citoplasma celular. A sua formação estrutural indica que é capaz de induzir a permeabilidade e desestabilidade de membranas (ALFIERI, 2007).

Três proteínas não estruturais (NS1, NS2 e NS3) são produzidas durante a replicação do VLA. A NS1 e NS2 são sintetizadas abundantemente, enquanto que a NS3 é de difícil detecção. A sequencia dessas proteínas é altamente conservada entre os sorotipos, o que indica a sua importância para a replicação desse vírus. A síntese da NS1 e NS2 coincide, respectivamente com o aparecimento de duas estruturas virais específicas: os túbulos e os corpúsculos de inclusão. Presume-se que estas estruturas estejam envolvidas na replicação e no processo de transporte das partículas virais para a membrana celular ou na preservação da mitose em células infectadas. A NS3 é a proteína menos abundante do VLA e a sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que é essencial para o egresso das partículas virais nas células (ALFIERI, 2007).

O VLA apresenta 26 sorotipos identificados (MAAN et al., 2012; ORTEGO & MERTENS, 2014). Alguns sorotipos do vírus, quando introduzidos numa população ovina podem afetar 50% a 75% do rebanho, com uma mortalidade variando entre 20% a 50% (RIET-CORREA et al., 1996).

Em 2014 detectou-se um novo sorotipo do VLA identificado como BTV-n, afetando cabras em Córsega, na França e este apresentou maior similaridade com o sorotipo 25 (ZIANTARA et al., 2014). Kyriaki Nomikou identificou recentemente o VLA sorotipo 28 no oriente médio (MAAN et al., 2015). No distrito de Montagu, Cabo Ocidental, também foi identificado um novo sorotipo do vírus a partir do sequenciamento de ácidos nucléicos e da análise sorológica em alpacas (*Vicugna pacos*) importadas do Chile um ano antes de apresentarem sinais clínicos compatíveis com a doença (WRIGHT, 2014).

1.3 Epidemiologia

A infecção pelo VLA é uma doença viral reemergente sustentada pelo complexo hospedeiro, vetor e patógeno. Além disso, ruminantes selvagens demonstram um importante papel como reservatório biológico do vírus (ORTEGO & MERTENS, 2014).

A respeito de reservatórios silvestres, na África foi encontrada a soroprevalência de anticorpo contra o VLA em níveis variados entre a maioria dos carnívoros africanos (guepardos, leões, gatos domésticos, cães selvagens, chacais, cães domésticos e hienas), provavelmente devido ao acesso de carne de ruminantes virêmicos (ALEXANDER, et al., 1994).

A doença está limitada as regiões tropicais e temperadas onde contenham espécies de vetores competentes (GIBBS & GREINER 1994, TABACHNICK, 2004). O principal grupo vetor responsável pela transmissão biológica de uma grande variedade de *Orbivirus* no mundo são os mosquitos do gênero *Culicoides*, família Ceratopogonidae ordem Diptera (CHAGAS & PINHEIRO, 2003; ORTEGO & MERTENS, 2014).

Está comprovada a presença e adaptação do vetorem diferentes regiões do mundo (MACLACHLAN et al. 2009). Existem mais de 1400 espécies de *Culicoides* descritas no mundo, no entanto menos de 20 estão envolvidas na epidemiologia do VLA. Na Europa, África e Ásia, *C. imicola* é considerado o vetor mais eficiente. Na Austrália os principais vetores são *C. waddai*, *C. brevitarsis*, *C. fulvus* e *C. actoni* (CHAGAS & PINHEIRO, 2003). Na América do Norte o *C. sonorensis* é responsável

pela transmissão do VLA e na América do Sul o principal vetor é *C. insignis* (TABACHNICK, 2004).

O vírus é encontrado nos fluidos dos *Culicoides*, inseto hematófago (ZACHARY, 2013) amplamente disseminado no Brasil. No Brasil o inseto é conhecido popularmente como “maruim”, “borrachudo”, “mosquito pólvora” ou “mosquito do manguê” (CHAGAS & PINHEIRO, 2003).

A infecção nos mosquitos pode permanecer por toda sua vida e a transmissão mecânica por carrapatos e moscas, como *Stomoxys* spp e *Tabanus* spp, também pode ocorrer (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996), assim como por outros insetos como *Aedes lineatopennis*, *Ornithodoros coriaceus* e *Melophagus ovinus* (RIET-CORREA, 2007).

A enfermidade afeta ovinos, bovinos e diversas espécies de ruminantes selagens, sendo os ovinos e o veado de rabo branco os mais suscetíveis (RIET-CORREA et al., 1996). A infecção pelo VLA pode causar a morte de ovinos, enquanto que a infecção em bovinos e caprinos, geralmente, é subclínica, tornando estas espécies também importantes reservatórios da doença (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE, 2000; PINHEIRO et al., 2003).

Todas as raças de ovinos são susceptíveis à doença clínica, no entanto o grau de susceptibilidade está relacionado às diferentes reações imunológicas de cada raça (WARD et al., 1994). Animais mais jovens são mais severamente afetados que os adultos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996). Além disso, pesquisas realizadas até o século XIX comprovaram que ovinos deslanados ou tosados apresentavam maior susceptibilidade à doença (SPREULL, 1905).

A infecção pelo VLA propagou-se dentro de vários ecossistemas devido à competência do vetor em transmitir o vírus. Estes ecossistemas são relativamente estáveis devido à colonização de animais e, principalmente, pelas práticas agrícolas tradicionais (GIBBS & GREINER, 1994).

A incidência e distribuição da doença estão relacionadas com o ambiente e fatores climáticos que afetam a sobrevivência e distribuição dos vetores (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

Dentre as variáveis climáticas, observa-se que a temperatura, umidade, pluviosidade e ventos influenciam na dinâmica populacional do vetor e a temperatura

elevada reduz a duração do ciclo gonotrófico e aumenta a taxa de picadas do vetor (CHAGAS & PINHEIRO, 2003).

Em condições de clima tropical é provável que a doença seja mais frequente no final da época das chuvas quando a população de mosquitos é maior. Em clima temperado a doença tem ocorrência sazonal, nos meses de verão e outono (RIET-CORREA, 2007). Embora haja estudos que demonstram não haver diferença estatística em soroprevalência de anticorpos contra o VLA entre as diferentes estações do ano (SABAGHAN et al., 2014).

Há variação do número de casos de infecção pelo VLA relacionado com a precipitação anual, assim a doença é menos frequente e mais branda nas estações secas. Além disso, a maior incidência de casos ocorre em regiões próximas de rios, represas ou lugares pantanosos. Os surtos também podem cessar após as primeiras geadas (SPREULL, 1905).

No Brasil condições de temperatura e umidade na maior parte do país favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores (LOBATO, 1996; CLAVIJO et al., 2002), o que pode tornar a doença endêmica e com alta prevalência (LOBATO, 1996).

Embora o VLA tenha sido identificado por isolamento e ou sorologia, a doença, muitas vezes, é silenciosa nos rebanhos brasileiros, principalmente através de seu vetor (PINHEIRO et al., 2003). Mas há relatos de surtos da infecção no Paraná, Rio Grande do Sul pelo sorotipo 12 e no Rio de Janeiro onde foi comprovada a circulação do VLA sorotipo 4 (CLAVIJO et al., 2002; ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014).

No Rio Grande do Sul, anticorpos para o VLA foram encontrados em bovinos e ovinos (RIET-CORREA et al., 1996). No sudeste e sudoeste do estado foi observada uma baixa prevalência de anticorpos contra o vírus, tanto em ovinos como em bovinos. No entanto, a presença do vetor *Culicoides* indicada que ocorre circulação viral mesmo em baixa escala. O fato de ter sido encontrado um grande número de animais soronegativos no Rio Grande do Sul é preocupante, pois pequenas mudanças climáticas em regiões limítrofes podem resultar em aumento na taxa de transmissão, pelo aparecimento de vetores (COSTA et al., 2006).

A infecção pelo VLA, bem como a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e a Diarreia Viral Bovina (BVD) foram detectadas no Brasil na década de 60, provavelmente através da importação de animais e de sêmen contaminado. É

importante destacar que em bovinos o VLA também pode ser transmitido através do sêmen, quando o touro estiver em processo de viremia (PELLEGRIN et al., 1997).

De acordo com a OIE, a infecção pelo VLA é uma doença notificável cujo impacto econômico decorre não apenas das perdas diretas nos rebanhos afetados, mas também das restrições econômicas impostas por países importadores (COSTA et al., 2006).

1.4 Patogenia

Os *Orbivirus* são transmitidos para os hospedeiros vertebrados por insetos hematófagos do gênero *Culicoides* (CHAGAS & PINHEIRO, 2003; ALFIERI, 2007; ORTEGO & MERTENS, 2014).

O vetor injeta o vírus no hospedeiro via saliva enquanto se alimenta. O hospedeiro infectado então passa por um período curto de incubação antes de desenvolver a viremia (WILSON et al., 2008).

Após a penetração cutânea o vírus infecta células de Langerhans, monócitos e macrófagos teciduais. Em seguida, essas células migram por via linfática para os linfonodos locais, agregados linfoides e linfonodos regionais. Nesses locais o vírus infecta linfócitos, células dendríticas, monócitos e macrófagos (ZACHARY, 2012).

A estrutura das camadas exteriores do capsídio do VLA tem papel fundamental na mediação da ligação celular e da penetração em diferentes tipos de células. Nos hospedeiros mamíferos estas proteínas de superfície externa também interagem com componentes do sistema imunológico induzindo a produção de anticorpos neutralizantes (MERTENS et al., 2004).

Após a replicação primária nos linfonodos regionais, as partículas virais se disseminam para o baço, timo e outros linfonodos associados às células sanguíneas. O VLA se liga a glicoforinas na superfície dos eritrócitos de bovinos e ovinos, onde persiste em invaginações da membrana. Nesses locais, o vírus permanece protegido dos anticorpos circulantes por longos períodos, resultando em viremia prolongada (ALFIERI, 2007).

Uma característica marcante da patogenia da infecção pelo VLA é a sua capacidade de replicar e destruir células endoteliais em diferentes órgãos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; ALFIERI, 2007; ZACHARY, 2012). Isso ocorre devido à

presença de macrófagos e monócitos infectados livres na circulação sanguínea que se aderem às células endoteliais por meio de moléculas da cascata de adesão leucocitária. Em seguida ocorre lise das células fagocíticas e liberação das partículas virais que se aderem à glicosaminoglicanas das membranas de células endoteliais através das proteínas estruturais do capsídeo (VP2 e VP5), culminando em vasculite e morte endotelial (ZACHARY, 2012).

Dependendo da gravidade da lesão endotelial a vasculite pode ser seguida por hemorragia, exsudação, edema vascular, estase e oclusão de vasos sanguíneos, causando hipóxia com consequente ulceração da mucosa oral, infarto tecidual e coagulação intravascular disseminada (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; ZACHARY, 2012). Tem sido observado que a exposição dos animais afetados a fatores estressantes exacerbam a doença (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

A interação entre o VLA e as células endoteliais de ovinos e bovinos é fundamental para compreender a patogênese nestas espécies. Na infecção em bovinos ocorre replicação localizada do vírus em células endoteliais que resulta em lise celular, assim suprime a replicação do vírus e induz a resposta inflamatória do hospedeiro, sem causar lesões graves. *In vitro* a infecção de células endoteliais de ovinos pelo VLA resulta na sobrevivência das células-alvo por períodos prolongados com maior produção de vírus comparado a infecção de células endoteliais de bovinos (RUSSELL et al., 1996).

Após a infecção a resposta inata é a primeira linha de defesa contra o vírus, envolvendo a produção de Interferon Tipo 1 (IFN-1, essencial para o estabelecimento de uma resposta celular antiviral) e de outras citocinas pró-inflamatórias que controlam a infecção. Em seguida é moldada a resposta imune adaptativa gerada pelas células T e B (ORTEGO & MERTENS, 2014).

A infecção pelo VLA é sensível ao efeito antiviral de IFN-1, causando diminuição da expressão de proteínas estruturais antivirais VP5 e VP7 e as proteínas não estruturais NS1 e NS3. Contudo, pesquisas demonstram que o VLA é capaz de interferir com a via JAK/STAT para modular a resposta através do IFN-1 (DOCEUL et al., 2014).

Em ruminantes a placentação zonária cotiledonar é favorável à infecção congênita. Esse tipo de placentação favorece a transferência de sangue e de componentes do plasma para o feto em desenvolvimento. Durante as fases iniciais de

viremia a fêmea prenhe tem o vírus circulante no plasma e o vírus acaba migrando através da placenta (OSBURN, 1994; SANTMAN-BERENDS et al., 2010; SAEGERMAN et al., 2011).

O vírus é capaz de atravessar a barreira placentária e infectar o feto resultando em necrose hepática, supressão do sistema hematopoiético fetal, nascimento de produtos com anormalidades, incluindo hidrocefalia, artrogripose, prognatismo, cegueira, surdez e aborto (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; ALFIERI, 2007).

Os produtos também podem nascer assintomáticos, porém, infectados, o que pode ser comprovado pela RT-PCR (SANTMAN-BERENDS et al., 2010; SAEGERMAN et al., 2011). Nos machos, a presença do vírus no sêmen causa mudança estrutural nos espermatozoides (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

1.5 Sinais clínicos

Dentre as espécies domésticas, os ovinos apresentam maior sensibilidade à doença e a manifestação clínica varia de acordo com a raça, idade e *status* imunológico dos ovinos afetados (BROWN et al., 2007; WORWA et al., 2008).

Em 1905, na Colônia do Cabo, descreveram-se sinais clínicos relacionados ao comprometimento da cavidade oral e dos dígitos de ruminantes infectados pelo VLA. Os animais, frequentemente, apresentavam pirexia, úlceras na cavidade oral, emagrecimento progressivo, anorexia, mucosas cianóticas, edema dos lábios, secreção nasal e, em casos mais graves, perda do epitélio da língua, ulcerações das narinas e aumento de volume com dor ao redor das coroas do casco (SPREULL, 1905).

Embora a primeira descrição tenha ocorrido há mais um século, a infecção pelo VLA ainda causa sinais comuns àquela época.

O curso clínico dos ovinos que morrem varia em média de dois a quatro dias e, nos ovinos que se recuperam é em média 15 dias. Tanto os ovinos que vem à óbito quanto os que se recuperam apresentam os mesmos sinais clínicos, mas com intensidade variada (ANTONIASSI et al., 2010).

Pirexia, erosões e petéquias da junção mucocutâneo dos lábios, focinho e da conjuntiva são evidentes. Descreve-se também edema da língua, lábios, face, pálpebras, orelhas, região submandibular e pescoço (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-

CORREA et al., 1996; CLAVIJO et al., 2002; WORWA et al., 2008; BALARO et al., 2014).

Atualmente nota-se também estomatite catarral, hemorragias, enterite, cianose da cavidade oral e nasal, laminite, torcicolo, hiperemia dos olhos e da mucosa oral e nasal, sialorréia, conjuntivite serosa à mucopurulenta, descargas nasais sanguinolentas com formação de crostas que podem interferir na respiração. Ocorre ainda anorexia, cianose da língua, necrose da mucosa oral, respiração fétida, relutância para se mover ou severa claudicação (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA et al., 1996; CLAVIJO et al., 2002; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013; BALARO et al., 2014).

Relata-se ainda dispneia, perda da lã e formação de uma linha avermelhada ou púrpura no rodete coronário em ovinos infectados pelo VLA (RIET-CORREA et al., 1996).

Em regiões onde a doença é enzoótica os sinais clínicos são mais leves ou inaparentes, com ocasionais abortos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA et al., 1996).

Em alguns casos há relatos de dificuldade de deglutição com episódios de regurgitação, bem como secreção nasal esverdeada mucosa ou mucopurulenta, tornando-se os sinais mais marcantes. Além de úlceras e hemorragias na mucosa oral também foram observadas em alguns ovinos (ANTONIASSI et al., 2010).

Há relatos de ovelhas que apresentam manifestação dos sinais clínicos de infecção pelo VLA no terço final da gestação e após a recuperação produzem borregos sadios (ANTONIASSI et al., 2010). No entanto, há relatos de aborto causado pela infecção (BALARO et al., 2014) e há casos de ovelhas prenhes que no ultimo trimestre da gestação apresentaram apenas sinais de comprometimento do sistema respiratório (BALARO et al., 2014).

A infecção pelo VLA está entre as doenças reprodutivas mais importantes em bovinos no Pantanal, juntamente com a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarreia Viral Bovina (BVD). Em bovinos a enfermidade caracteriza-se por febre, salivação intensa, úlceras na cavidade oral, escoriações, lesões nos tetos, coronite e laminite, provocando andar cambaleante (PELLEGRIN et al., 1997).

Vacas virêmicas e que não abortaram são capazes de gerar produtos sadios, porém infectados. O teste da RT-PCR pode comprovar que tanto a fêmea quanto o

terneiro podem ser positivos, o que comprova a transmissão vertical do vírus. Esses animais positivos na RT-PCR desempenham um importante papel na epidemiologia da doença (SANTMAN-BERENDS et al., 2010).

1.6 Lesões macroscópicas

No exame *post mortem* de ovinos infectados pelo VLA são encontradas lesões na pele e na mucosa, como escoriações e ulcerações no interior dos lábios, nas bochechas e na língua (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA, 2007; BALARO et al., 2014).

Na mucosa do esôfago, rúmen, retículo e abomaso são evidenciadas hiperemia, petéquias, erosões ou ulcerações. Enterite catarral ou hemorrágica associada a hiperemia e edema são frequentes (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA, 2007).

Os linfonodos faríngeo, submandibulares, cervical e torácico podem estar aumentados de tamanho e edemaciados (KUSILUKA & KAMBARAGE; 1996, SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013; BALARO et al., 2014). Pode haver petéquias nos mesmos (SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013).

Na traqueia relata-se grande quantidade de espuma, além de hidrotórax e edema pulmonar (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013). Observa-se com frequência pneumonia aspirativa (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA, 2007; ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014) ou o pulmão apresenta-se difusamente avermelhado e não colabado (ANTONIASSI et al., 2010; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013; BALARO et al., 2014). As conchas nasais podem apresentar coloração vermelho-escuro e conter conteúdo alimentar (ANTONIASSI et al., 2010).

Dentre as lesões macroscópicas são observadas hemorragias sistêmicas que são mais graves em ovinos do que em bovinos, devido suscetibilidade diferenciada das células endoteliais à infecção, causando variação quanto à gravidade da lesão endotelial (ZACHARY, 2012).

A presença de petéquias e equimoses na base da artéria pulmonar são características da doença (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA,

2007; ANTONIASSI et al., 2010; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013; BALARO et al., 2014).

No coração observa-se focos de hemorragia no epicárdio e endocárdio (RIET-CORREA, 2007; ANTONIASSI et al., 2010; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013; BALARO et al., 2014).

No músculo esquelético é descrita hemorragia associada à necrose (KUSILUKA & KAMBARAGE; 1996; RIET-CORREA, 2007).

O esôfago frequentemente apresenta dilatação, estando preenchido com grande quantidade de conteúdo alimentar, que pode ser encontrado também e no lúmen da traqueia e de brônquios associado a um conteúdo espumoso (ANTONIASSI et al., 2010).

Há relatos de esplenomegalia, hemorragias no epicárdio e hidropericárdio com exsudação de fibrina (KUSILUKA & KAMBARAGE; 1996). Além de ruminite e reticulite mononuclear e pododermatite (BALARO et al., 2014).

Outras lesões também são descritas, como congestão hepática, hiperemia da mucosa do jejuno e íleo, petéquias no pâncreas, hiperemia e petéquias nos rins, na bexiga e nas meninges (SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013).

Nos fetos são observados hiperemia generalizada e malformação (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996). Como o VLA tem afinidade por células indiferenciadas do cérebro geralmente ocorre alterações citolíticas resultando em necrose maciva com hidranencefalia e porencefalia (MACLACHLAN & OSBURN, 1983).

1.7 Lesões microscópicas

Nos linfonodos é encontrada hiperplasia linfoide. Nos cornetos observa-se acentuada hiperemia e nos pulmões há pneumonia aspirativa, caracterizada por infiltrado de neutrófilos no interior de alvéolos, bronquíolos e brônquios associado com material vegetal, ocorrendo com frequência contaminação bacteriana secundária. No pulmão observa-se ainda edema, hiperemia e focos de hemorragia. Lesões microscópicas também são observadas no epitélio do rúmen, como ulceração, necrose associada à mineralização, hemorragia e trombose. No intestino delgado pode haver encurtamento de vilosidades, necrose de criptas e infiltrado mononuclear na mucosa. (ANTONIASSI et al., 2010).

No músculo esquelético observa-se degeneração muscular, principalmente nos músculos do pescoço, resultado em torcicolo. A degeneração hialina observada está frequentemente associada à hemorragia, necrose e mineralização de miofibras, além de infiltrado de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

Descreve-se ainda degeneração hialina e flocular bifásica em miofibras da camada muscular do esôfago associado com infiltrado mononuclear, áreas de mineralização de miofibras e focos de hemorragia. Tais alterações também são encontradas, variando quanto à intensidade da lesão, no miocárdio. No endocárdio, epicárdio e base da artéria pulmonar são observadas extensas áreas de hemorragia (ANTONIASSI et al., 2010).

Em fetos infectados pelo VLA há relatos de encefalite necrotizante, encefalite e meningite não supurativa, predominantemente no telencéfalo, cavitações delimitadas por células necróticas, principalmente nas regiões rostrais do cérebro, microcavitações no cerebelo e trombos no plexo coroide (MACLACHLAN & OSBURN, 1983).

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo VLA é baseado na epidemiologia, sinais clínicos, lesões macroscópicas e identificação do vírus, que é realizado por métodos virológicos e sorológicos no intuito de diferenciar a infecção pelo VLA de outras doenças virais (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

Os testes diagnósticos para identificação do vírus no hospedeiro são por métodos diretos ou indiretos.

O diagnóstico direto é realizado através da inoculação do material suspeito em Ovos de Galinha Embrionados (OEG) ou em ovinos susceptíveis (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA et al., 1996). Isolamento de cepas de campo do VLA requer a amplificação em OGE (AFSHAR, 1994).

O vírus é isolado do sangue ou suspensão de amostras de tecido do animal suspeito, seguida de inoculação em OEG com 10-12 dias de vida (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996). O procedimento de inoculação é intravenoso, esse talvez seja o passo mais importante no processo de isolamento. Os embriões morrem entre três e seis

dias após inoculação do vírus. Em seguida, são necessárias duas passagens em série da amostra em cultivo celular (CARIJO et al., 2000).

O vírus também é isolado diretamente em cultivos celulares ou em camundongos lactentes (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA et al., 1996). A maioria dos laboratórios de diagnóstico utiliza a passagem de cultura de células para identificar a presença do VLA (CARIJO et al., 2000). As células, geralmente utilizadas são BHK 21, células VERO e células L de cobaio (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

Atualmente está sendo adotando em muitas pesquisas o diagnóstico através do exame molecular em tempo real da Transcrição Reversa da Polimerase (RT-PCR), sendo realizada avaliação filogenética do vírus por RT-PCR (BALARO et al., 2014).

Também é realizado o ensaio de imunoperoxidase que permite a localização do antígeno específico dentro da célula infectada utilizando o anticorpo monoclonal específico (CARIJO et al., 2000). São fornecidas vantagens aos testes de imunoperoxidase, tais como a facilidade e a rapidez da leitura de placas (AFSHAR et al., 1991).

Embora as técnicas modernas, como RT-PCR e a hibridização *in situ* têm sido descritas para a identificação de ácidos nucleicos do VLA. É necessária uma identificação final do isolado para excluir outras orbivirose, como o vírus da doença hemorrágica epizootica (CARIJO et al., 2000).

Em fetos abortados é realizado a RT-PCR que permite verificar se o produto é positivo para o vírus (SANTMAN-BERENDS et al., 2010; SAEGERMAN et al., 2011). O teste da RT-PCR revela que a placenta de ovelhas PCR-positivas que pariram cordeiros positivos, geralmente contém partículas virais (SAEGERMAN et al., 2011).

O desenvolvimento de métodos eficazes para a purificação de partículas do VLA também fornecem material para análise eletroforética e estudos bioquímicos, além de prover partículas homogêneas em quantidade e pureza suficiente para cristalizar, permitindo estudos de sua estrutura atômica (MERTENS, et al., 2004).

Os métodos de diagnóstico indireto são usados em levantamentos epidemiológicos, como o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA ou AGID) que detecta anticorpos contra o VLA (CHAGAS & PINHEIRO, 2003).

Deve-se salientar que os métodos indiretos têm limitações para diagnóstico, já que indicam apenas se o animal teve contato com o vírus. A realização de provas

sorológicas pareadas, associadas a um quadro clínico compatível e descartadas outras possíveis causas dos sinais e lesões observados, constituem-se fortes evidências de que se trata da infecção pelo VLA (RIET-CORREA, 2007).

O diagnóstico indireto para a detecção de anticorpos é realizado pelas provas de IDGA, RFC, IF ou ELISA. A primeira é mais utilizada já que os anticorpos precipitantes são detectáveis por vários anos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA et al., 1996).

Anteriormente, as técnicas clássicas para identificação do VLA eram com base em ensaios imunológicos que incluem anticorpos fluorescentes e neutralização viral. Sendo que o uso de anticorpos fluorescentes, fixação do complemento e neutralização viral eram os testes mais comumente aplicados para a sorotipagem dos isolados virais. Os avanços na compreensão da genética molecular levou ao desenvolvimento de sondas genéticas por análise de hibridação e RT-PCR para a detecção de ácido nucleico do VLA (AFSHAR, 1994).

A infecção pelo VLA faz parte da lista de doenças vesiculares do Ministério da Agricultura de notificação compulsória que deve ser feita ao Órgão de Defesa Animal municipal (BALARO & BRANDÃO, 2013). Portanto, convém saber que há ensaios que detectam de forma confiável todos os sorotipos e estirpes de VLA com alta sensibilidade e especificidade, como RT-PCR, detectado-se o ácido nucleico viral. Também estão disponíveis comercialmente ensaios específicos de ELISA competitivos para detecção sorológica de infecção pelo VLA (MACLACHLAN & MAYO, 2013).

1.9 Diagnóstico diferencial

Deve ser realizado o diagnóstico diferencial com febre aftosa, ectima contagioso e com outras causas de malformações em animais recém-nascidos (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA, 2007).

Formas graves de ectima contagioso podem ser confundidas com infecção pelo VLA. No entanto a infecção pelo VLA apresenta manifestações sistêmicas e alta mortalidade. A varíola ovina e caprina também são um importante diagnóstico diferencial, no entanto a varíola é altamente fatal comparada à infecção pelo VLA (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

Na dermatose ulcerativa, as crostas são vistas na face, patas e órgãos genitais de ovinos, mas são planas e não elevadas (BARROS, 2007).

A infecção pelo VLA ainda deve ser diferenciada de podridão do pé, poliartrite e dermatose ulcerativa. (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996).

Outros importantes diagnósticos diferenciais são: dermatite pustular infecciosa, hemonose aguda, fotossensibilização hepatógena, peste dos ruminantes, distrofia muscular nutricional associada à deficiência de selênio e vitamina E. A infecção pelo VLA também tem demonstrado semelhança aos sinais clínicos de outras verminoses. Ou seja, doenças comumente relatadas no campo. Deste modo, é provável que a infecção pelo VLA seja subdiagnosticado (BALARO & BRANDÃO, 2013).

Em bovinos como os sinais clínicos da infecção pelo VLA são parecidos com os da IBR e BVD deve ser feito o diagnóstico diferencial (PELLEGRIN et al., 1997).

1.10 Controle e profilaxia

O controle deve ser baseado em ações integradas envolvendo o vetor, o hospedeiro e o ambiente (OIE, 2014). De maneira geral, o controle é realizado através da eliminação do vetor ou protegendo os animais suscetíveis (MACLACHLAN & MAYO, 2013).

Com relação ao vetor, sua erradicação é difícil. Assim, medidas como evitar pastagens úmidas baixas, confinar os animais no final da tarde até o início da manhã, realizar a tosquia no início do verão para que os animais já tenham lã no final do verão e uso de repelentes são indicados. Inseticidas e larvicidas (sob autorização) também podem ser utilizados nas propriedades. A aplicação de cal, embaixo do aprisco e no local onde ficam as fezes acumuladas na propriedade, também é importante para diminuir o número de mosquitos no ambiente (OIE, 2014).

Mesmo em áreas endêmicas o controle da população de mosquitos deve ser realizado. Embora a infecção pelo VLA ocorra apenas esporadicamente, devido à imunidade da população, há sempre o potencial para surtos da doença a partir de um vírus ancestral mais virulento ou após a introdução de uma nova estirpe ou sorotipo do vírus em uma região propícia para sua propagação (MACLACHLAN & MAYO, 2013).

Quanto aos hospedeiros suscetíveis, é necessário instaurar programas estratégicos que permitam a circulação segura dos animais (MACLACHLAN &

MAYO, 2013; MAAN et al., 2015). Limitar a propagação do vírus é uma meta geral de qualquer programa de controle instituído em regiões livres da presença do vírus, evitando que a doença torne-se enzoótica (MACLACHLAN & MAYO, 2013).

Na última década, uma série de ensaios de RT-PCR foram desenvolvidos fornecendo métodos diagnósticos eficientes e confiáveis para a detecção do RNA do VLA. Estes ensaios são importantes no diagnóstico e na vigilância do sorotipo circulante (MAAN et al., 2015), pois o controle da doença pode ser por meio da vacinação sorotipo-específica (MACLACHLAN & MAYO, 2013; REDDY et al., 2015).

Estratégias de vacinação preventivas podem ter o objetivo de prevenir ou limitar a doença a um nível mínimo (GRAESBOLL et al., 2014). A vacina é adequada para reduzir as perdas econômicas na pecuária de ovinos onde a infecção pelo VLA é endêmica, como países da Europa e na República da África do Sul. (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE, 2000).

Várias vacinas têm sido utilizadas na Europa desde o surgimento do VLA, atualmente baseadas em vírus inativado. A vacinação contribuiu significativamente para a redução da circulação do vírus, promovendo em algumas áreas, sua erradicação (ZIENTARA & SÁNCHEZ-VIZCAÏNO, 2013).

No Brasil, considerando a falta de dados sobre a ocorrência da doença clínica, não se justifica a utilização de vacinas (RIET-CORREA, 2007). A falta de conhecimento dos sorotipos existentes no Brasil e a sua distribuição nos diferentes estados dificultam o controle e a adoção de medidas que evitem a introdução de novos sorotipos no país ou em áreas específicas (COSTA et al., 2006).

Para o Brasil é importante adquirir animais importados sorologicamente negativos ao VLA (RIET-CORREA, 2007). Devem-se seguir rigorosamente as regras de importação e quarentena dos animais, incluindo o teste sorológico preconizado pelo Escritório Internacional de Epizootias que é de IDGA. O conhecimento dos tipos de vírus existentes é importante do ponto de zoonosológico e econômico. A compra e o transporte dos animais devem ser supervisionados e na ocorrência de casos positivos, deve ser feita a eutanásia do animal imediatamente (CHAGAS & PINHEIRO, 2003).

Em bovinos recomenda-se que uma vez confirmada a presença de algumas dessas doenças no rebanho e o seu efeito sobre a produtividade (abortos, repetições de cio ou infertilidade) o produtor analise a relação custo-benefício das formas de controle disponíveis e seja realizado o descarte de animais positivos (PELLEGRIN et al., 1997).

Há relatos de que algumas vacinas podem causar abortos ou malformações quando administradas nas primeiras semanas de gestação (30 a 60 dias) (KUSILUKA & KAMBARAGE, 1996; RIET-CORREA, 2007).

Outro fator que limita a doença é seu ciclo natural de infecção que promove imunização do rebanho após exposição natural à doença, associada às condições climáticas de inverno frio que afetam a população de insetos vetores (ZIENTARA & SÁNCHEZ-VIZCAÏNO, 2013).

Estratégias para controlar os surtos de VLA dependem da rápida detecção do vírus (vigilância virológica) ou da doença (vigilância clínica), e deve ser usado ensaios de diagnóstico sensíveis e específicos para a detecção do vírus (MACLACHLAN & MAYO, 2013). O objetivo é reduzir a morbidade e mortalidade entre espécies suscetíveis de infecção pelo VLA, pois surtos da doença acarretam sérias perdas econômicas para os produtores. (MACLACHLAN & MAYO, 2013).

2. ARTIGO

Neste item é apresentado o artigo que relata Surtos de Infecção pelo Vírus da Língua Azul em Ovinos no Rio Grande do Sul – Brasil, que será submetido à publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Trabalho

Surtos de Língua Azul em ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil¹

Lorena L.B. Guimarães², Raquel Aparecida S. da Cruz², Matheus de O. Reis², Luciana Sonne², Saulo P. Pavarini²,
& David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Guimarães L.L.B., Cruz R.A.S., Reis M.O., Pavarini S.P., Sonne L. & Driemeier D. 2014. [.] Surtos de infecção pelo vírus da língua azul em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Prédio 42505, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

The infection Bluetongue Virus (BTV) occurs in domestic and wild ruminants, preferably sheep, cattle and goats in tropical and temperate regions where the vector, mosquito of genus *Culicoides*. From January to October 2014 were diagnosed seven outbreaks of infection in sheep VLA in the state of Rio Grande do Sul. The clinical findings were related to the respiratory and locomotor system, mainly characterized by dyspnea and lameness. The sheep mortality ranged from 1.7 to 56%. In necropsy major changes were: hyperemia and food content in the nasal cavity (7/10), increased lung size with marked edema (6/10), anterior-ventral pulmonary consolidation (5/10), haemorrhage heart (5 / 10), haemorrhage from the pulmonary artery (4/10) and mild swelling and sagging of the esophagus (4/10). Histological findings included aspiration pneumonia (3/10), purulent rhinitis (1/10), muscle necrosis of the esophagus (10/10), haemorrhage heart (3/10), cardiomyocyte necrosis (2/10) and necrosis of muscle cervical ventral serratus (8/10). To confirm the suspicion were collected 23 blood samples from patients recovered and sheep, and a cow. RT-PCR and virus isolation test proved infection and blue tongue virus serotype 4 was identified in two outbreaks.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

²Setor de Patologia Veterinária (SPV), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Prédio 42505, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

INDEX TERMS:sheep industry, aspiration pneumonia, muscle necrosis, esophagus.

RESUMO.- A infecção pelo Vírus da Língua Azul (VLA) ocorre em ruminantes domésticos e selvagens, preferencialmente, ovinos, bovinos e caprinos em regiões tropicais e temperadas onde há o vetor, mosquito do gênero *Culicoides*. De janeiro a outubro de 2014 foram diagnosticados sete surtos de infecção pelo VLA em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul. Os achados clínicos relacionavam-se com o sistema respiratório e locomotor, caracterizados principalmente por dispneia e claudicação. A taxa de mortalidade de ovinos variou de 1,7 a 56%. Nas necropsias as principais alterações observadas foram: hiperemia e conteúdo alimentar na cavidade nasal (7/10), pulmões aumentados de tamanho com intenso edema (6/10), consolidação pulmonar antero-ventral (5/10), hemorragias no coração (5/10), hemorragia da artéria pulmonar (4/10) e discreta dilatação e flacidez do esôfago (4/10). Os achados histológicos caracterizaram pneumonia aspirativa (3/10), rinite purulenta (1/10), necrose muscular do esôfago (10/10), hemorragias no coração (3/10), necrose de cardiomiócitos (2/10) e necrose do músculo serrátil cervical ventral (8/10). Para confirmar a suspeita foram coletadas 23 amostras de sangue de ovinos doentes e recuperados, e de um bovino. O teste da RT-PCR e isolamento viral comprovou infecção pelo vírus da língua azul e foi identificado o sorotipo 4 em dois surtos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ovinocultura, pneumonia aspirativa, necrose muscular, esôfago.

INTRODUÇÃO

O Vírus da Língua Azul (VLA) causa uma infecção não contagiosa e que afeta ruminantes domésticos e selvagens, preferencialmente, ovinos, bovinos e caprinos. A doença está restrita as regiões tropicais e temperadas (Gibbs&Greiner 1994), isso se deve a presença e adaptação do vetor, mosquitos do gênero *Culicoides*, em diferentes regiões do mundo (Maclachlan et al. 2009). Dentre as espécies domésticas, os ovinos apresentam maior sensibilidade à doença, e a manifestação clínica varia de acordo com a raça, idade e *status* imunológico dos ovinos afetados. A infecção em bovinos usualmente é assintomática ou subclínica (Brown et al. 2007).

O VLA pertence ao gênero *Orbivirus* e à família Reoviridae, (Mertens et al. 2004, Brown et al. 2007, OIE 2014) e existem 26 sorotipos com patogenicidade distinta (Maan et al. 2012). O vírus é caracterizado por seu genoma de 10 segmentos de dsRNA divididos em três segmentos grandes (L1 a L3), três médios (M4 a M6) e quatro pequenos (S7 a S10), com capacidade de codificar sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e três proteínas não estruturais (NS1 a NS3) (Alfieri et al. 2007). O vírus não é encapsulado e apresenta capsídeo icosaédrico (Mohl & Roy 2014).

Em 2013 no Brasil foi identificado o sorotipo 4 no Estado do Rio de Janeiro afetando um rebanho ovino criado em regime extensivo (Balaro et al. 2014). Anteriormente no Brasil, foram identificados os sorotipos 12 (Clavijo et al. 2002, Antoniassi et al. 2010a), respectivamente, no Paraná e no Rio Grande do Sul.

O objetivo desse trabalho é descrever os aspectos clínicos e anatomopatológicos de sete surtos de infecção pelo VLA em ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil, confirmados pelo isolamento viral e teste da RT-PCR, comprovando a participação do sorotipo 4 em dois destes surtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Em 2014 atendeu-se sete propriedades no estado do Rio Grande do Sul (Fig.1) com histórico de mortalidade de ovinos nos municípios de Taquara (Propriedade A), Fazenda Vilanova (Propriedade B), Viamão (Propriedades C e F), Cachoeira do Sul (Propriedade D e E) e Venâncio Aires (Propriedade G).

Durante as visitas, dados epidemiológicos e de sinais clínicos foram obtidos junto aos proprietários e médicos veterinários.

Dos dez ovinos e um feto submetidos à necropsia, coletaram-se amostras de fígado, rim, baço, linfonodos, coração, artéria pulmonar, pulmão, intestinos delgado, intestino grosso, encéfalo, esôfago, músculo serrátil cervical ventral, pró-ventrículos, abomaso, língua, orelha e pele da região labial. Estas foram fixadas em solução de formalina tamponada 10%, processadas rotineiramente e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

Amostras de sangue em tubo Hemogardtm com e sem EDTA foram coletadas de todos os ovinos submetidos à necropsia, de 15 ovinos e 1 bovino da Propriedade D, e de 5 ovinos da Propriedade E. Destas amostras obteve-se lavados de hemácia que foram

refrigerados e encaminhados para o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da UFMG, também foram enviadas amostras congeladas de baço, fígado, rim, coração, pulmão e linfonodo dos dez ovinos submetidos à necropsia (Ovinos 1-10) e o macerado dos órgãos do feto abortado, para a realização do isolamento viral e RT-PCR (Favero 2009) e tipificação viral (Maan et al. 2012).

RESULTADOS

Dados epidemiológicos e clínicos

Os ovinos foram ordenados de 1 a 10, e os dados epidemiológicos de cada propriedade, bem como os sinais clínicos de cada ovino estão apresentados na Quadro 1.

A taxa de mortalidade observada em cada propriedade foi de 25% (Propriedade A), 56% (Propriedade B), 1,7% (Propriedade C), 28% (Propriedade D), 13% (Propriedade E) e 42% (Propriedade G). Na Propriedade F não foi possível obter as informações necessárias para o cálculo devido perda de contato com o proprietário.

Alterações macroscópicas

Os principais achados de necropsia nos dez ovinos necropsiados foram: cianose da língua (Ovinos 1-10), discreta dilatação e flacidez do esôfago (Ovinos 4, 5 e 6) (Fig.2), hiperemia e conteúdo alimentar na cavidade nasal (Ovinos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) (Fig.3). Os pulmões não estavam colapsados, apresentavam consistência elástica e abundante quantidade de líquido espumoso no inteiro de tranqueia e brônquios (Ovinos 1, 4, 5, 6, 7 e 9), por vezes com áreas multifocais de consolidação, predominantemente cranioventral (Ovinos 1, 3, 4, 8 e 10) (Fig.4). Havia ainda material vegetal no interior dos brônquios (Ovino 1). Observou-se também petéquias multifocais no epicárdio mais acentuada no ventrículo esquerdo (Ovinos 1, 4, 5, 6 e 7) e área focal de hemorragia transmural medindo entre 1-3 cm de diâmetro na artéria pulmonar (Ovinos 2, 6, 7 e 8).

Os cascos dos ovinos submetidos à necropsia não apresentaram alterações. O feto abortado pelo Ovino 7 não exibiu alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas

Todos os ovinos apresentaram no esôfago necrose muscular, caracterizada por miofibras marcadamente eosinofílicas, com bordos arredondados, em secção transversal (Fig.5A)e, por vezes, hipercontraídas e com perda de estriações. Associado às miofibras necróticas (Fig.5B) havia infiltrado de macrófagos em atividade fagocítica (Fig.5C). Embora estas lesões estivessem presentes nos dez ovinos submetidos à necropsia, as lesões variaram quanto à intensidade e região esofágica (porção cranial, medial e caudal) (Tabela 2).

Nos esôfagos havia ainda vasculite leve a moderada na submucosa, caracterizada por infiltrado de linfócitos (Ovinos 2, 3, 4, 6 e 8) e neutrófilos (Ovinos 2, 4 e 5), além de hemorragia multifocal na adventícia e proliferação de tecido conjuntivo fibroso (Ovinos 3 e 5). Nos Ovinos 7 e 8 observou-se discreta quantidade de miofibras com redução de diâmetro e alinhamento central dos núcleos (regeneração muscular). Apenas no Ovino 4 havia deposição de material granular basofílico (mineralização) em miofibras. Ulceração do epitélio da mucosa do esôfago foi evidenciada nos Ovinos 2 e 7.

No coração havia necrose do miocárdio com infiltrado acentuado de macrófagos em um ovino (Ovino 8). No Ovino 5 foram observadas áreas multifocais de hemorragia severa associada a necrose aguda de cardiomiócitos. Havia também hemorragia multifocal moderada no epicárdio (Ovinos 1, 4 e 5) e miocárdio, além de trombose multifocal e congestão acentuada (Ovino 7). Na túnica adventícia da artéria pulmonar havia hemorragia moderada (Ovinos 2, 6, 7 e 8).

Observou-se no músculo serrátil cervical ventral (Ovinos 1-8) miofibras tumefeitas e hipereosinofílicas (necrose hialina), frequentemente, com floclulação de miofibras e fragmentação de fibras associada a infiltrado de macrófagos em atividade fagocítica, variando quanto à intensidade (Tabela 2).

Na cavidade nasal do Ovino 9 havia acentuado infiltrado de neutrófilos entre cornetos associado a hemorragia e grande quantidade de material inerte refringente (fibra vegetal).

Broncopneumonia supurativa foi observada em sete ovinos (Ovinos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) caracterizada por infiltrado acentuado de neutrófilos no interior de brônquios e bronquíolos (Ovinos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e, ocasionalmente, no interior dos alvéolos

(Ovinos 2 e 3) e no espaço intersticial (Ovinos 5 e 7), por vezes associada a presença de fibra vegetal no interior de bronquíolo (pneumonia aspirativa) (Ovinos 1, 3 e 4) (Fig.6). Havia ainda trombose (Ovinos 3 e 4), hemorragia (Ovinos 2 e 5), exsudação de fibrina (Ovinos 4 e 5), além de edema e hiperemia que estavam presente em todos os casos.

A pele da região labial dos Ovinos 5, 6, 7 e 8 apresentou infiltrado perivascular de linfócitos e eosinófilos multifocal moderado associado a discreto infiltrado de mastócitos.

O feto do Ovino 7 não apresentou lesões histológicas.

Caracterização molecular

O isolamento viral e a RT-PCR comprovaram a positividade ao VLA dos dez ovinos submetidos à necropsia e das amostras de sangue dos 20 ovinos com sinais clínicos e assintomáticos presentes nas propriedades De E, bem como no sangue do bovino da Propriedade D. Pela análise filogenética do vírus, realizada nos animais das Propriedades D e E, foi identificado o sorotipo 4. No teste da RT-PCR o feto foi negativo para VLA.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O diagnóstico de infecção pelo vírus da língua azul nos surtos aqui descritos baseou-se nos achados clínico, anatomopatológico, isolamento do vírus e RT-PCR. Em um estudo sorológico prévio realizado no Estado do Rio Grande Sul demonstrou-se a baixa prevalência da infecção pelo VLA comparada a outras regiões do Brasil (Costa et al. 2006). Isso implica em rebanhos sorologicamente negativos e susceptível ao VLA, o que explica o surto ocorrido em 2009 no estado (Antoniassi et al. 2010a) e, através destes novos surtos, podemos considerar que o vírus continua se difundido pelo RS causando a morte de ovinos durante todo o ano.

Na Argentina o sorotipo 4 foi isolado de bovinos assintomáticos (Gorsch et al. 2002), demonstrando a importância desta espécie como fonte de transmissão do VLA. Corroborando com esses achados, em uma propriedade dos surtos aqui descritos foi identificado através de RT-PCR o VLA em um bovino assintomático.

Os sinais clínicos de ovinos infectados com o VLA podem ser variados, e dependem do sorotipo do vírus e *status* imunológicos do rebanho. Clinicamente a doença pode ser classificada como aguda ou crônica. Nos casos aqui apresentados as alterações são compatíveis com a forma aguda da doença, devido sua apresentação clínica (Kusiluka & Kambarage 1996, Antoniassi et al. 2010a, Balaro et al. 2014).

A claudicação observada em ovinos infectados pelo VLA é causada pela inflamação das bandas coronárias, ocasionando hiperemia, aumento da temperatura e dor (Kusiluka & Kambarage 1996). Edema e hemorragia podem ocorrer como resultado de lesões nas lâminas subjacentes (Brown et al. 2007). Quando há laminite associada à hemorragia, o casco pode apresentar uma linha escura paralela à borda coronária, que também pode ser observada em cascos recuperados (Brown et al. 2007). Os ovinos desse estudo apresentaram claudicação, sem lesões podais e, possivelmente essas alterações locomotoras podem estar relacionadas às lesões musculares observadas.

Durante a necropsia os ovinos apresentam a língua edematosa, congesta ou cianótica, dando o nome da doença (Brown et al. 2007). Erosões e ulcerações ao longo da margem da língua, e, mucosa oral, esôfago e pré-estômagos também são descritos em ovinos infectados pelo VLA (Balaro et al. 2014, Antoniassi et al. 2010b). Contudo, observamos ulceração apenas no epitélio do esôfago de dois ovinos, sem comprometimento da cavidade oral e pré-estômagos.

Lesões hemorrágicas na artéria pulmonar foram predominantes nos ovinos deste trabalho. Geralmente as hemorragias ocorrem na túnica média, na superfície da íntima ou na adventícia e podem ter até 3,0 cm. Estas são consideradas muito características de infecção pelo VLA (Maclachlan et al. 2009, Balaro et al. 2014).

O edema pulmonar, alteração comum em ovinos infectados pelo VLA (Balaro et al. 2014), foi observado, frequentemente, nos ovinos desse estudo. Outra alteração pulmonar foi à pneumonia aspirativa, que também é relatada em ovinos com o VLA e está relacionada com aspiração de conteúdo ruminal após episódios de refluxo decorrentes da acentuada lesão na musculatura do esôfago (Antoniassi et al. 2010a). Embora histologicamente tenha sido observada broncopneumonia supurativa em sete animais, apenas três apresentaram pneumonia aspirativa, provavelmente, em decorrência do local da coleta da amostra não conter exemplares de fibra vegetal.

Após a infecção pelo VLA ocorre replicação viral em células endoteliais com destruição da parede de vasos (Kusiluka & Kambarage 1996). Portanto, frequentemente,

há lesões associadas à hemorragia, exsudação, edema, congestão e oclusão dos vasos sanguíneos, que podem causar hipóxia e necrose tecidual. Tais lesões foram visualizadas no pulmão, esôfago, artéria pulmonar, coração e músculo esquelético dos ovinos em nosso trabalho.

No exame histológico do músculo esquelético de animais acometidos pela doença, degeneração muscular e hemorragias são comuns e podem ser encontradas nos músculos do pescoço, o que pode causar quadros de torcicolo nos ovinos (Kusiluka & Kambarage 1996). Microscopicamente havia também necrose e mineralização de fibras musculares e embora a lesão do músculo serrátil cervical ventral tenham sido acentuada e extensa, os ovinos não apresentaram sinais de torcicolo durante os surtos.

A transmissão do VLA pode ocorrer através da picada de insetos, como os *Culicoides* e podem causar lesões cutâneas em ovinos, denominadas dermatite sazonal alérgica, com formação de pápulas, alopecia e crostas. As áreas mais comumente afetadas são periocular, orelhas, nariz, lábios e abdômen ventral (Corrêa et al. 2007). Nos ovinos deste estudo foi possível identificar através de exame histopatológico lesões compatíveis com dermatite alérgica nos lábios de alguns ovinos, sugerindo a possível participação do vetor na transmissão da doença.

Poucos casos da doença clínica tinham sido descritos no Brasil, a maioria deles na região Sul, área de ocorrência epidêmica para infecção pelo VLA. Os primeiros surtos relatados ocorreram no estado do Paraná, em abril de 2001 e fevereiro de 2002 (Clavijo et al. 2002, revisado por Lager 2004; OIE 2015). Ovinos e caprinos apresentaram sinais clínicos compatíveis com a enfermidade e alguns deles morreram. O teste de neutralização viral foi usado para tipificar o VLA e o sorotipo 12 foi identificado no primeiro surto (Clavijo et al. 2002) Em março e abril de 2009, dois surtos ocorreram no Rio Grande do Sul, em duas fazendas diferentes, afetando ovelhas. O diagnóstico de infecção pelo VLA sorotipo 12 envolvido neste surto foi confirmado por RT-PCR e sequenciamento (Antoniassiet al. 2010). De janeiro a abril de 2013, as ovelhas de uma fazenda em Vassouras, Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, apresentaram resultados clínicos e patológicos sugestivos de infecção pelo VLA. O sorotipo 4 foi identificado por análise molecular (Balara et al. 2014).

A infecção de ovelhas pelo VLA pode resultar em abortos e no nascimento de produtos com anormalidades, incluindo hidrocefalia, artrogripose, prognatismo, cegueira e surdez (Alfieri et al. 2007). Outras alterações descritas em fetos abortados em

decorrência da infecção pelo VLA são hiperemia generalizada e hemorragia focal (Kusiluka & Kambarage 1996). Nos exames realizados no feto abortado não foi isolado o vírus e tão pouco observadas tais lesões, assim, o abortamento, provavelmente, ocorreu em consequência da hipertermia das fêmeas prenhes que ocorre nos casos agudos de infecção pelo VLA.

Formas graves de ectima contagioso podem ser confundidas com infecção pelo VLA. A varíola ovina e caprina também são um importante diagnóstico diferencial (Kusiluka & Kambarage, 1996). No ectima contagioso, as crostas são vistas na face, patas e órgãos genitais de ovinos, mas são planas e não elevadas (Barros, 2007). Outros importantes diagnósticos diferenciais são: dermatite pustular infecciosa, hemonose aguda, fotossensibilização hepatógena, distrofia muscular nutricional associada à deficiência de selênio e vitamina E (Balara & Brandão, 2013). Além disso, foram observados casos de hemorragia na artéria pulmonar associada à intoxicação por ionóforos (Aldo Gava, dados não publicados).

A infecção pelo VLA gera impacto econômico e sanitário diretos pela perda da condição corporal, diminuição da produção de leite, infertilidade e aborto, e determina custos indiretos associados com restrições do comércio internacional (Legisa et al. 2013). Portanto a doença torna-se de grande importância para o Rio Grande do Sul, pois a distribuição do VLA, combinada a sua alta patogenicidade, deverá desencadear prejuízos maiores para o estado nos próximos anos.

Os surtos de mortalidade pelo VLA em diferentes estações do ano e regiões no Rio Grande do Sul demonstram a ampla distribuição e adaptação do vírus neste estado. O que comprova que a infecção pelo VLA deve ser considerada como uma importante doença de ovinos na região e que maiores estudos epidemiológicos devem ser realizados para que medidas de controle e prevenção da mesma possam ser efetivadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfieri A.A., Alfieri A.F., Takiuchi E. & Lobato Z.I.P. 2007. Reoviridae, p.775-805. In: Flores E.F. (Ed.), *Virologia Veterinária*. Vol.1. 1ª ed. Editora UFSM, Santa Maria.

Antoniassi N.A.B., Pavarini S.P., Henzel A., Flores E.F. & Driemeier. 2010a. Aspiration pneumonia associated with oesophagealmyonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. *Vet. Rec.* 166:52-53.

Antoniassi N.A.B., Pavarini S.P., Ribeiro L.A.O., Silva M.S., Flores E.F. & Driemeier D. 2010b. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30:1010-1016.

Balaro M.F.A., Lima M.S., Fava C.D., Oliveira G.R., Pituco E.M. & Brandão F.Z. 2014. Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26:567-570.

Balaro M., Brandão F.Z. Língua azul em ruminantes domésticos: desmitificando a doença. FarmPoint. Disponível em: <<http://m.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/lingua-azul-em-ruminantes-domesticos-desmitificando-a-doenca-84921n.aspx>>. Acessado em: 30 de janeiro de 2015.

Barros C.S.L. Ectima contagioso. In: *Doenças de ruminantes e equídeos*. Riet-Correa F., Schild A. L., Lemos R.A.A., Borges J.R.J. (Eds.). 3ªed. Vol. 1.Pallotti, Santa Maria. 98-102 p. 2007.

Brown C.C., Baker D.C. & Barker I.K. 2007. Alimentary system, p.3-296. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Calvo-Pinilla E., Nieto J.M. & Ortego J. 2010. Experimental oral infection of bluetongue virus serotype 8 in type I interferon receptor-deficient mice. *J. Gen. Virol.* 91:2821–2825.

Corrêa T.G., Ferreira J.M., Riet-Correa G., Ruas J.L., Schild A.L., Riet-Correa F., Guimarães A. & Felipe-Bauer M.L. 2007. Seasonal allergic dermatites in sheep in Southern Brazil caused by *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Vet. Parasitol.* 145:181-185.

Costa J.R.R., Lobato Z.I.P., Herrmann G.P., Leite R.C. & Haddad J.P.A. 2006. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:273-275.

Favero C.M. Padronização e aplicação de técnicas de diagnósticos para o Vírus da Língua Azul (VLA) e da Doença Hemorrágica Epizoótica dos Cervídeos (DHEC). Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFMG. 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/SSLA-87CJ2F>>. Acessado em: 30 de janeiro de 2015.

Gibbs E.P.J. & Greiner E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17:207-220.

Grocock C.M. & Campbell C.H. 1982. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.* 46:160-164.

Kusiluka L., Kambarage D. 1996. Bluetongue. *Diseases of small ruminants in Sub-Saharan Africa. Vetaid:Scotland*, 1-116p.

Legisa D., Gonzalez F., Stefano D., Pededa A. & Dus Santos M.F. 2013. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. *J. Gen. Virol.* 94:652-662.

Maan N.S., Maan S., Belaganahalli M.N., Ostlund E.N., Johnson D.J., Nomikou K. & Mertens P.P.C. 2012. Identification and differentiation of the twenty six Bluetongue Virus Serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific Genome Segment 2. *Plos One.* 7:1-9.

Maclachlan N. J., Drew C. P., Darpe K. E. & Worwa G. 2009. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Path.* 141:1-16.

Mertens P.P., Diprose J., Maan S., Singh K.P., Attoui H. & Samuel A.R. 2004. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet. Ital.* 40:426-437.

Mohl B.P. & Roy P. 2014. Bluetongue virus capsid assembly and maturation. *Viruses.* 6:3250-3270.

OIE. 2014. Terrestrial Manual. Bluetongue. p.1-18.

Quadro 1. Aspectos clínicos e epidemiológicos em surtos de língua azul no Rio Grande do Sul em 2014.

Propriedade	Ovino nº	Raça	Epidemiologia	Sinais Clínicos
A	1	Santa Inês	Total de 20 ovinos, 5 adoeceram e 5 morreram. Curso clínico médio de 5 dias	Taquipneia, taquicardia, pirexia e atonia ruminal, evoluindo para dispneia e cianose
B	2	Texel	50 ovinos foram comprados de uma propriedade no município de Guaíba-RS, 28 morreram 60 dias após. Curso clínico de 3 a 5 dias	Apatia, hiporexia, depressão e secreção nasal serosa de coloração esverdeada, evoluindo para dispneia
C	4		Hampshire down	Total de 230 ovinos, 8 adoeceram e 4 morreram. Curso clínico médio de 7 dias
D	5	Texel	Total de 45 ovinos, 13 morreram 20 dias após os animais participarem de uma exposição. Curso clínico de 7 -10 dias	Apatia, disfagia, tosse, sialorreia, cianose, secreção nasal serosa de coloração esverdeada e claudicação em 80% dos ovinos
E	7		Texel	Total de 80 ovinos, em um mês 25 ovelhas adoeceram e 11 morreram. Curso clínico de 5-7 dias. Também houve um aborto
F	8	Corriedale	Morreu 5 dias após o início dos sinais	Apatia, anorexia e dispneia
G	9 10	Texel	Total de 70 ovinos, 30 morreram. Curso clínico de 1-3 dias	Dispneia, pirexia, salivação, secreção nasal e claudicação

Tabela 2. Intensidade e distribuição de necrose muscular no esôfago e no músculo serrátil cervical ventral em ovinos com língua azul.

Ovino n°	Intensidade			
	Esôfago			Músculo serrátil cervical ventral
	Cranial	Medial	Caudal	
1	+	+	+	+
2	+	++	+	+++
3	+	+	+	+
4	+++	+++	+++	+
5	+++	+++	+++	+++
6	0	++	+++	+++
7	+	++	++	+
8	+++	+++	+++	+++
9	+	+	+	0
10	0	+	+	0

0 = ausente, + = discreto, ++ = moderado e +++ = acentuado.

Figura 1: Distribuição das sete propriedades com surtos de língua azul no Rio Grande do Sul, Brasil.

Figura 2: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Esôfago com discreta dilatação e aspecto de flacidez.

Figura 3: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Cavidade nasal hiperêmica e com conteúdo alimentar.

Figura 4: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Pulmões não colabados e com áreas de consolidação no lobo cranial direito e na porção cranial do lobo cranial esquerdo.

Figura 5: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Esôfago. (A) Infiltrado multifocal moderado de macrófagos na camada muscular. HE, obj.10x.(B) Infiltrado de macrófago entre fibras musculares e necrose multifocal de miofibras. HE, obj.40x.

Figura 6: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Pulmão. Broncopneumonia supurativa. HE, obj.4x.

Figura 7: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Pulmão. Broncopneumonia associada à presença de fibra vegetal no interior de bronquíolo. HE, obj.40x.

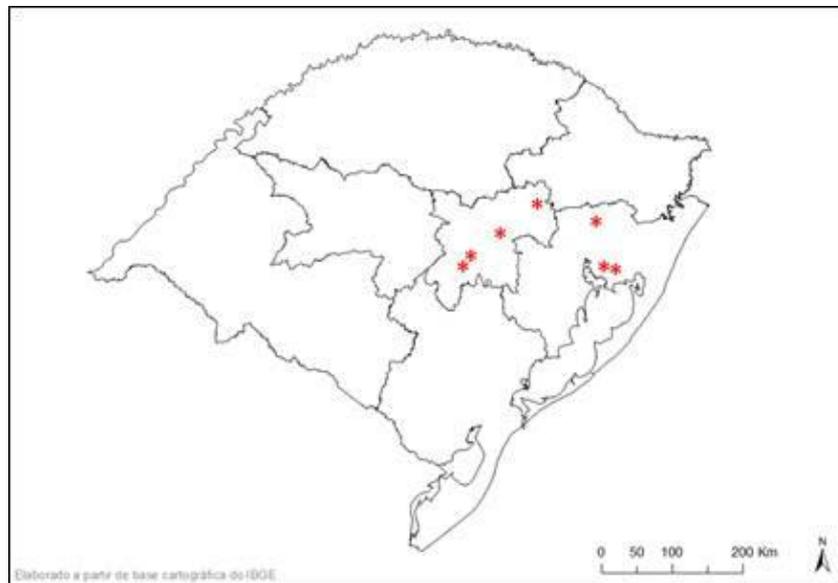


Figura 1.

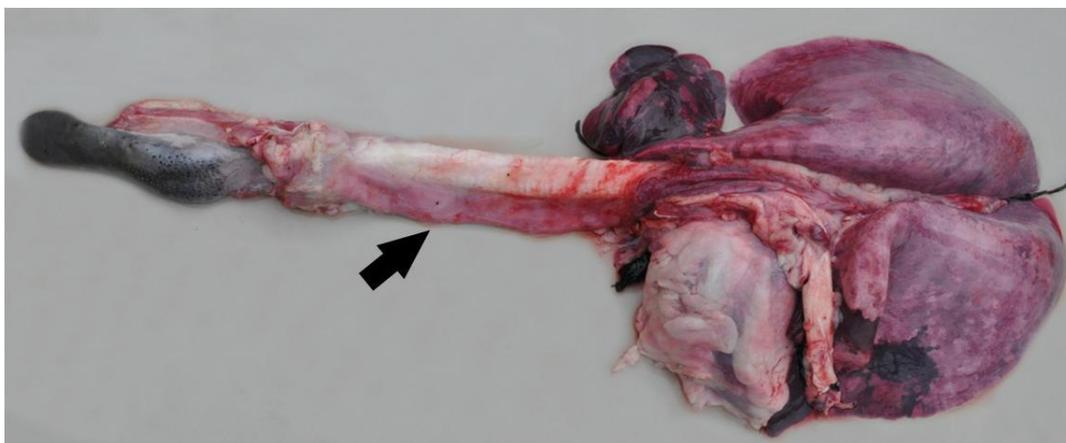


Figura 2.



Figura 3.

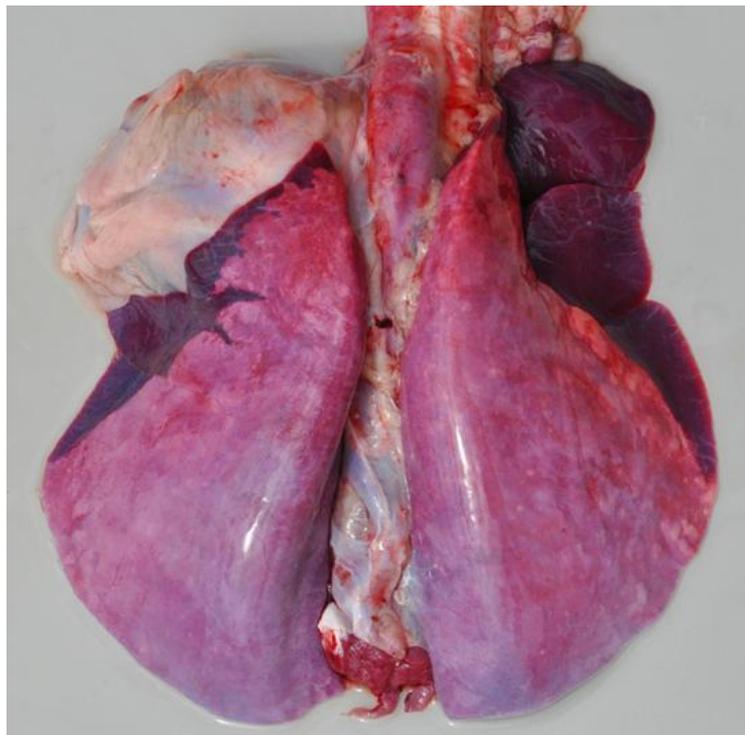


Figura 4.

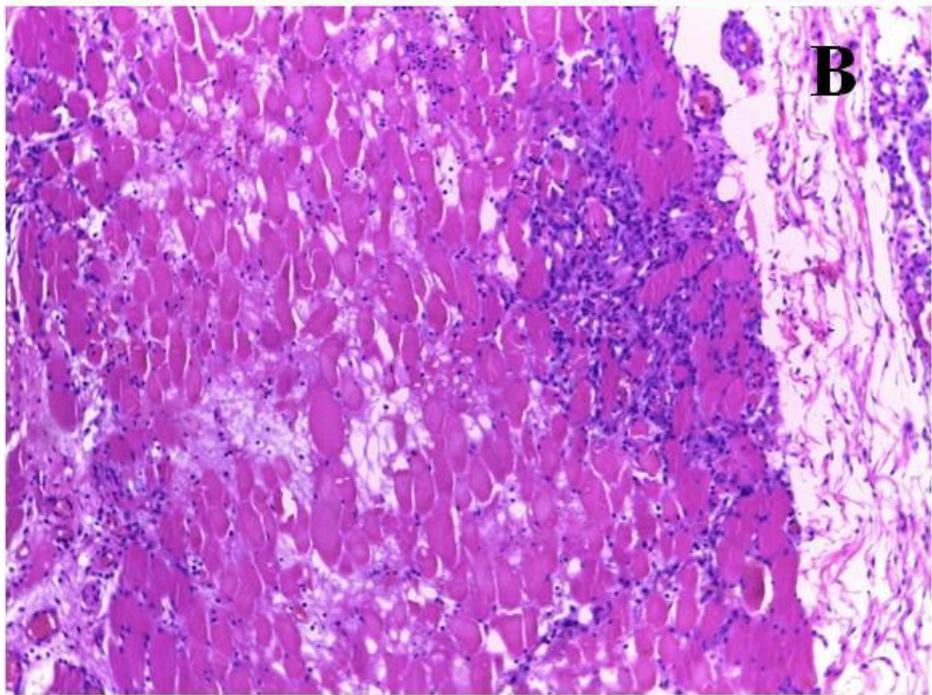
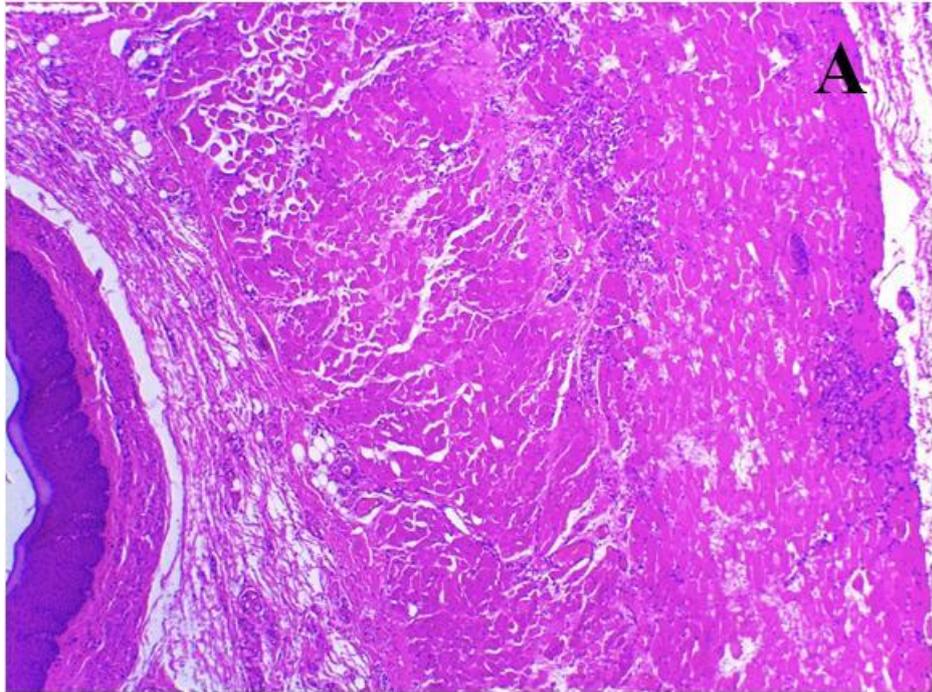


Figura 5.

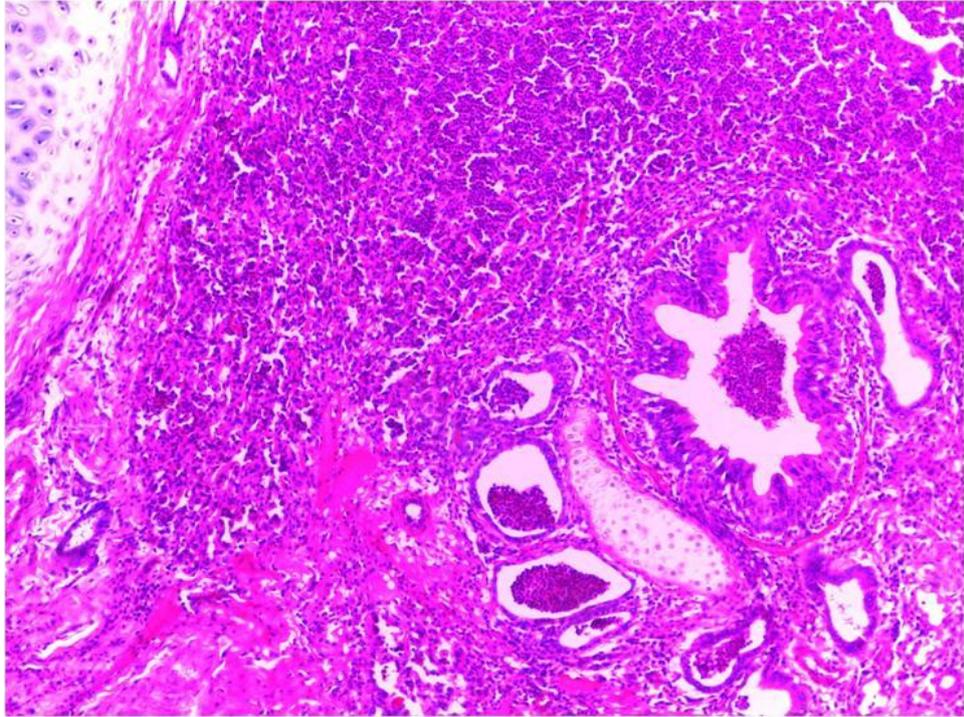


Figura 6.

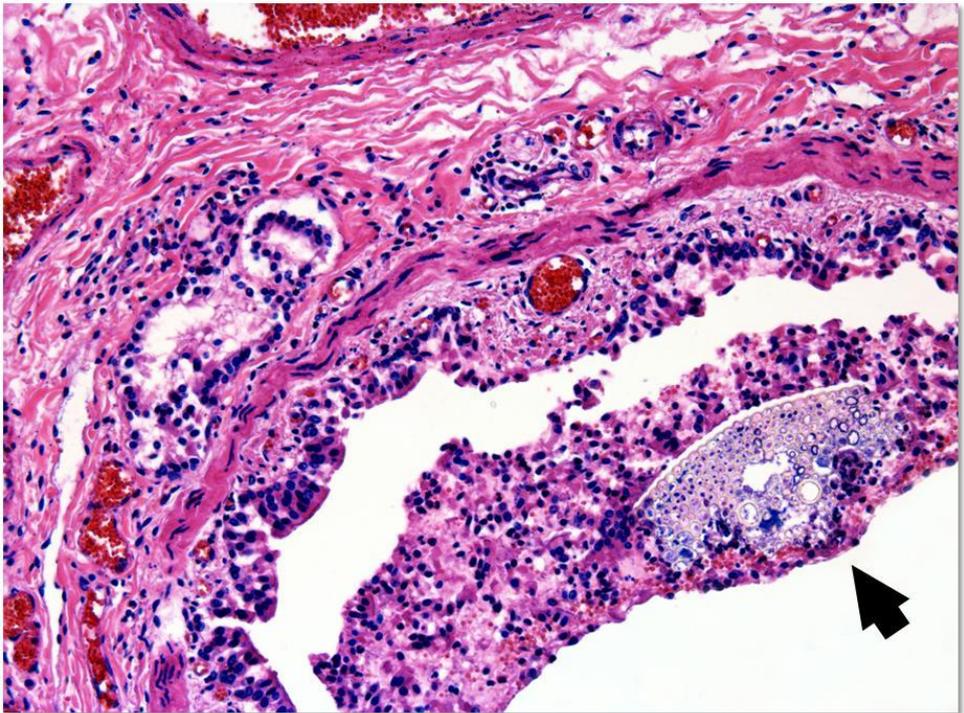


Figura 7.

3. FIGURAS ADICIONAIS



Figura 1: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Aprisco localizado as margens de lagoa.



Figura 2: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Ovino com secreção nasal mucosa de coloração esverdeada.



Figura 3: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Secreção nasal mucosa de coloração esverdeada.



Figura 4: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Secreção nasal catarral e com aumento de volume da face.



Figura 5: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Mucosa oral cianótica.

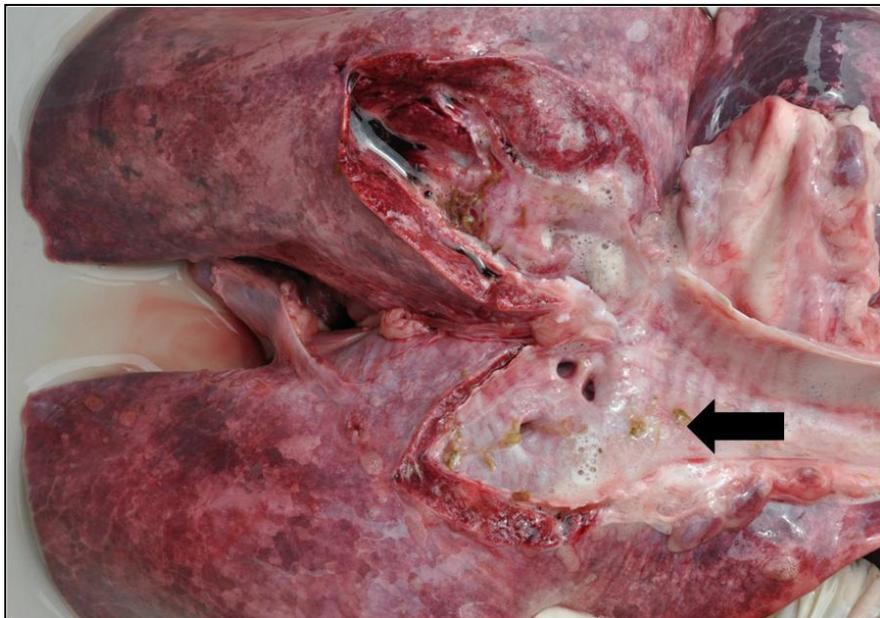


Figura 6:—Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Material vegetal no interior de brônquios.

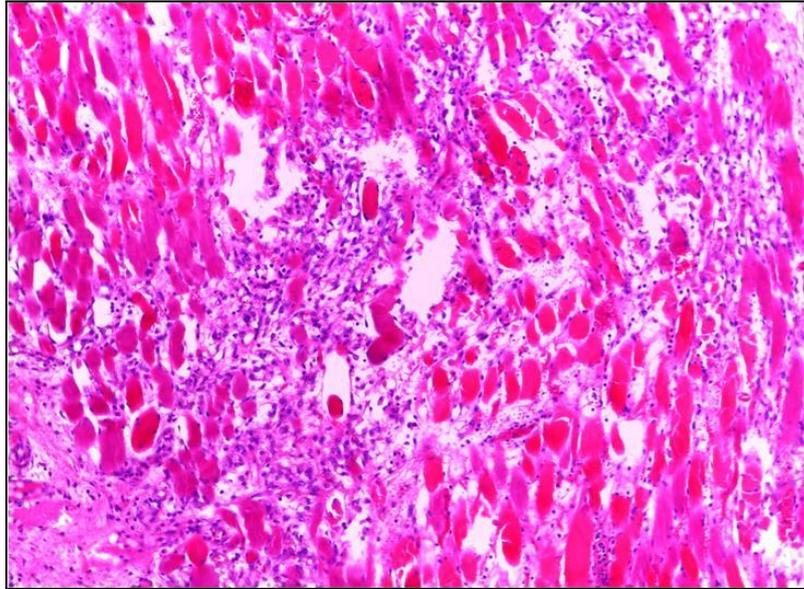


Figura 7: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Músculo serrátil cervical ventral. Infiltrado multifocal acentuado de macrófagos associado à necrose multifocal acentuada de miofibras, caracterizada por fibras marcadamente eosinofílicas, hipercontraídas e com perda de estriações. HE, obj.20x.

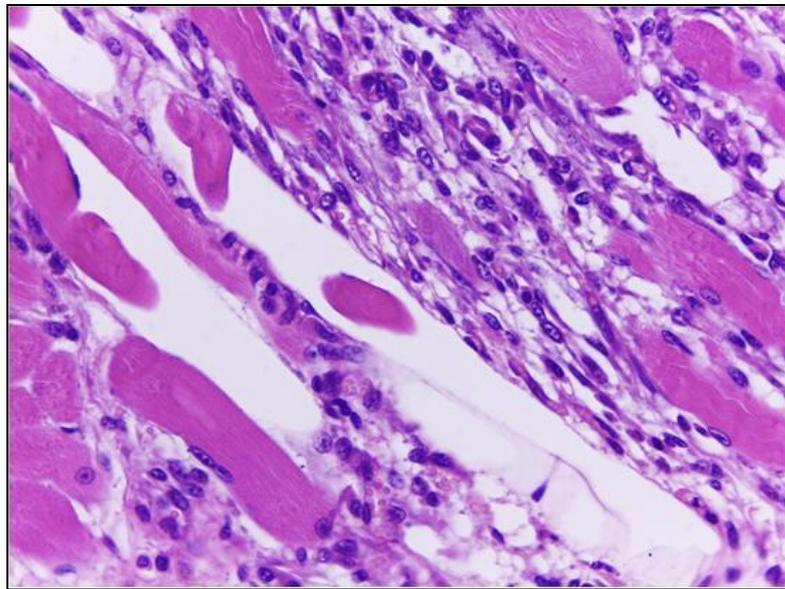


Figura 8: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Esôfago com infiltrado acentuado de macrófagos em atividade fagocítica associado à necrose e fragmentação de miofibras. HE, obj.40x.

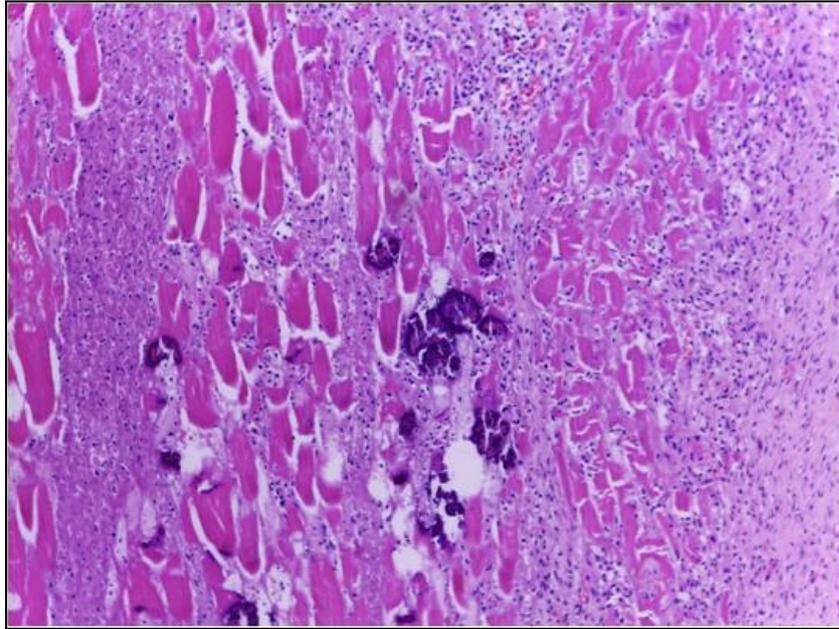


Figura 9: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Músculo serrátil cervical ventral. Infiltrado acentuado de macrófagos associado a intensa proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, além de áreas multifocais de mineralização, HE, obj.20x.

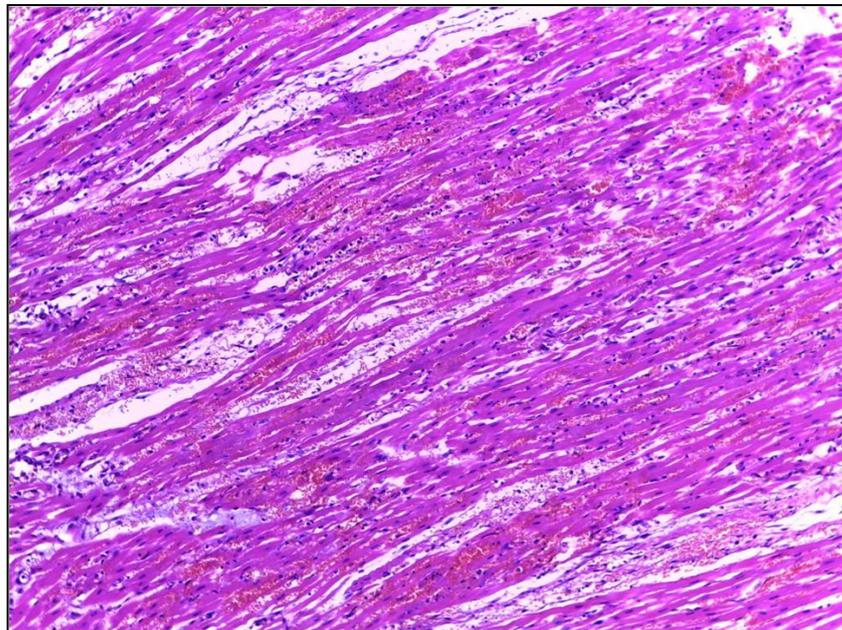


Figura 10: Infecção natural pelo vírus da Língua Azul em ovinos. Coração. Áreas multifocais de hemorragia acentuada associado a discreto infiltrado inflamatório mononuclear. HE, obj.20x.

4. DISCUSSÃO GERAL

O diagnóstico de infecção pelo vírus da língua azul nos sete surtos descritos no artigo baseou-se nos achados clínico, anatomopatológico, isolamento do vírus e RT-PCR para o VLA.

Pesquisas mundiais têm comprovado o impacto econômico e sanitário da infecção pelo VLA na ovinocultura. Embora as perdas diretas causem grandes prejuízos econômicos aos produtores, decorrentes da morbidade e mortalidade da infecção, as perdas indiretas, provocadas pela barreira sanitária, são mais relevantes no cenário mundial.

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), a ovinocultura e a caprinocultura têm se destacado no agronegócio brasileiro. A ovinocultura tem representatividade na região nordeste e no estado do Rio Grande do Sul (RS). A produção anual alcança 11 milhões de toneladas de lã, principalmente no RS, com cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários. Assim, a sanidade do rebanho ovino é fundamental para a lucratividade do agronegócio brasileiro, especialmente para o RS.

A instauração de programas de controle para a infecção pelo VLA tornou-se necessária no Brasil, pois está comprovada a circulação do vírus nos rebanhos bovino, ovino e caprino (ANTONIASSI et al., 2010; CLAVIJO et al. 2002; BALARO et al., 2014).

Para criar programas de controle no Brasil, novos estudos epidemiológicos são necessários, em especial do ciclo silvestre da doença. A população de antas brasileiras (*Tapirus terrestris*) tem papel importante como reservatório silvestre do VLA no bioma pantanal e na mata atlântica, com prevalência, respectivamente de 2,8 % e 15,6%, indicada por testes sorológicos (MEDICI et al., 2014). Outra espécie silvestre que tem demonstrado sorologia positiva para o VLA é o cateto ou porco-do-mato (*Pecari tajacu*) com 39% das amostras positivas (19/49) no estado de São Paulo (GERBER et al., 2012). E, um inquérito sorológico para detectar anticorpo contra o VLA em bubalino do estado de Minas Gerais revelou, pelo teste de IDGA, 54,4% de amostragem positiva (LAGE et al., 1996). No entanto, é necessário compreender o impacto que esses dados têm sobre a doença no país.

É evidente que o Brasil é um país com dimensão continental e que devido sua extensão apresenta grande variação de relevo e clima, com variação entre estações de

seca e chuva. No entanto, a temperatura e a pluviosidade colaboram para a distribuição uniforme do vetor *Culicoides* pelo país, garantindo uma maior concentração do inseto nas estações com maior precipitação pluviométrica (CARVALHO & SILVA, 2014).

O Brasil possui todos os fatores que permitem sustentar o ciclo da infecção pelo VLA, ou seja, os reservatórios silvestres do vírus, os hospedeiros susceptíveis eo vetor. Segundo, CARPENTER et al.(2013), essa situação é suficiente para que ocorra surtos e epidemias da doença.

Até o momento, no país foi identificado o VLA sorotipo 4 apenas no estado do Rio de Janeiro (BALARO et al. 2014). Na América do Sul, esse mesmo sorotipo foi isolado apenas na Argentina através de RT-PCR a partir do segmento 2 do genoma (LEGISA et al., 2013), semelhante ao realizado em nosso trabalho, pois sabe-se que este segmento é o responsável pela diferenciação entre os 26 sorotipos do VLA.

No RS havia sido identificado somente o VLA sorotipo 12 (ANTONIASSI, et al., 2010), no entanto, em nosso trabalho foi isolado de dois surtos apenas o sorotipo 4. Contudo sabemos que pode haver a associação de outros sorotipos, que ainda serão investigados.

5. CONCLUSÕES

O VLA está presente no estado do Rio Grande do Sul (RS) e causa doença clínica e a morte de ovinos em diferentes municípios.

O diagnóstico dos sete surtos de infecção pelo VLA em apenas um ano é indicativo de que a doença pode aumentar sua ocorrência pelo estado.

O VLA causou alta morbidade e mortalidade de ovinos nestes sete surtos investigados.

As lesões provocadas pelo VLA são, essencialmente, caracterizadas por necrose muscular. Pneumonia aspirativa pode ser observada em decorrência de necrose da camada muscular do esôfago.

Em alguns casos a lesão da camada muscular foi mais intensa no terço médio e caudal do esôfago.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, A. Bluetongue: laboratory diagnosis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. Oxford, v.17, n. 3/4, p.221–242. 1994.

AFSHAR, A., DUBUC, C., DULAC, G.C., THOMAS, F.C., NIELSEN, K., HENNING, D. Dot immunoperoxidase assay using monoclonal antibody for detection of bluetongue virus antigen. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 31, n. 1, p.105–112. 1991.

ALEXANDER, K.A., MACLACHLAN, N. J., KAT, P.W., HOUSE, C., O'BRIEN, S.J., LERCHE, N.W., SAWYER, M., FRANK, L.G., HOLEKAMP, K., SMALE, L., MCNUTF, J.W., LAURENSEN, M.K., MILS, M.O.L., OSBURN, A.I. Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Philadelphia, v. 51, n. 5, p.568-576. 1994.

ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F., TAKIUCHI, E. & LOBATO, Z.I.P. 2007. Reoviridae, p.775-805. In: Flores E.F. (Ed.), **Virologia Veterinária**. Vol.1. 1ª ed. Editora UFSM, Santa Maria.

ANTONIASI, N.A.B., PAVARINI, S.P., RIBEIRO, L.A.O., SILVA, M.S., FLORES, E.F., DRIEMEIER, D. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo Vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 30, n. 12, p. 1010-1016. 2010.

BALARO, M., BRANDÃO, F.Z. Língua azul em ruminantes domésticos: desmitificando a doença. FarmPoint. Disponível em: <<http://m.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/lingua-azul-em-ruminantes-domesticos-desmitificando-a-doenca-84921n.aspx>>. Acessado em: 30 de janeiro de 2015.

BARROS, C.S.L. Ectima contagiosa. 2007. In: **Doenças de ruminantes e equídeos**. RIET-CORREA, F., SCHILD, A. L., LEMOS, R.A.A., BORGES, J.R.J. (Eds.). 3ª ed. Vol. 1. Pallotti, Santa Maria. 98-102 p.

CARPENTER, S., MARTIN, H.G., GARROS, C., FELIPPE-BAUER, M.L., PURSE, B.V. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. **Antiviral Research**. Amsterdam, v. 100, n. 1, p.102-113. 2013.

CARVALHO, L.P.C., SILVA, F.S. Seasonal abundance of livestock-associated *Culicoides* species in northeastern Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**. Oxford, v. 28, n. 2, p. 228-231. 2014.

CHAGAS, A., C., S., PINHEIRO, R., R. (Eds). **Língua Azul: conhecer para prevenir. EmbrapaCaprinos**. 1ed. 2003.9-27p.

CLAVIJO, A., HECKERT, R.A., DULAC, G.C., AFSHAR, A. Isolation and identification of bluetongue virus. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v.87, p. 13-23. 2000.

CLAVIJO, A., SEPULVEDA, L., RIVA, J., PESSOA-SILVA, M., TAILOR-RUTHES, A., LOPEZ, J.W. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **Veterinary Record**. London, v. 151, n. 10, p.301-302. 2002.

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

DOCEUL, V., CHAUVEAU, E., LARA, E., BRÉARD, E., SAILLEAU, C., ZIENTARA, S., VITOUR, D. Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. **Journal of Virology**. Washington, v. 88, n. 18, p. 10792-10802. 2014.

DU TOIT, R.M. The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**. Pretoria, v. 19, n. 1-2, p.7-17. 1944.

GERBER, P.F., GALLINARI, G.C.F., CORTEZ, A., PAULA, C.D., LOBATO, Z.I.P., HEINEMANN, M.B. Orbivirus infections in collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in Southeastern Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**. Ames, v.48, n.1, p. 230-232. 2012.

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

GORMAN, B.M. Bluetongue virus. 1990. In: **The bluetongue virus. Current Topics in Microbiology and Immunology**. ROY, P., GORMAN, B.M. (Eds.). vol 162, pp 1-19.

GRAESBOLL, K., ENOE, C., BODKER, R., CHRISTIANSEN, L.E. Optimal vaccination strategies against vector-borne diseases. **Spatial and Spatio-temporal Epidemiology**. Oxford, v. 11, n. 11, p.153-162. 2014.

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

KUSILUKA, L., KAMBARAGE, D. 1996. Bluetongue. **Diseases of small ruminants in Sub-Saharan Africa**. Vetaid:Scotland, 1-116p.

LAGE, A.P., Castro, R.S., MELO, M.I., AGUIAR, P.H., BARRETO FILHO, J.B., LEITE, R.C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**. Montpellier, v.49, n. 3, p. 195-197. 1996.

MAAN, N.S., MAAN, S., BELAGANAHALLI, M.N., OSTLUND, E.N., JOHNSON, D.J., NOMIKOU, K., MERTENS, P.P.C. Identification and differentiation of the twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. **PLoS ONE** 7(2): e32601. doi:10.1371/journal.pone.0032601.

MACLACHLAN, N. J., DREW C. P., DARPEL K. E. & WORWA G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. **Journal of Comparative Pathology**. Edinburgh, 141:1-16. 2009.

MACLACHLAN, N.J., MAYO, C.E. Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging, *Culicoides*-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. **Antiviral Research**. Amsterdam, v.99, n. 2, p.79-90. 2013.

MACLACHLAN, N.J., OSBURN, B.I. Bluetongue virus-induced hydranencephaly in cattle. **Veterinary Pathology**. Washington, vol. 20, n. 5, p.563-573. 1983.

MAPA. 2015. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>>. Acessado em: 01 de fevereiro de 2015.

MEDICI, E.P., MANGINI, P.R., SANTOS, R.C.F. Health assessment of wild lowland tapir (*Tapirus terrestris*) populations in the atlantic forest and pantanal biomes, Brazil (1996-2012). **Journal of Wildlife Disease**. Ames, v.50, n. 4, p. 817-828. 2014.

MERTENS, P.P.C., BROWN, F., SANGAR, D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. **Virology**. New York, v. 135, n. 1, p.207-217. 1984.

MERTENS, P.P.C., DIPROSE, J., MAAN, S., SINGH, K.P., ATTOUI, H., SAMUEL, A.R. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. **Veterinaria Italiana**. Teramo, v. 40, n.4, p.426-437. 2004.

MOHL, B.P. & ROY, P. Bluetongue virus capsid assembly and maturation. **Viruses**. Switzerland, v. 6, n. 8, p.3250-3270. 2014.

OIE, 2015. Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>>. Acessado em: 13 de janeiro de 2015.

OIE. 2014. Terrestrial Animal Health Code. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/chapitre_bluetongue.pdf>. Acessado em: 15 de janeiro de 2014.

ORTEGO, J., MERTENS, P.P. Bluetongue vírus revisited. **Virus Research**. Amsterdam, v. 182, p.1-2. 2014.

OSBURN, B.I. The impact of bluetongue virus on reproduction. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. Oxford, v. 17, n. 3/4, p.189-196. 1994.

PELLEGRIN, A.O., SERENO, J.R.B., LEITE, R.C., FIGUEIREDO, H.C.P. Doenças da reprodução em bovinos no pantanal: Ocorrência de animais soropositivos para os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e língua azul. Comunicado técnico n. 20. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, p. 1-7. 1997.

PINHEIRO, R.R., CHAGAS, A.C.S., ADRIOLI, A., ALVES, F.S.F. Vírus de pequenos ruminantes. 1ª ed. **Embrapa caprinos**: Sobral. Documento, 46. p.1-30. 2003.

REDDY, Y.V., KRISHNAJYOTHI, Y., SUSMITHA, B., DEVI, B.V., BRUNDAVANAM, Y., GOLLAPALLI, S.R., KARUNASRI, N., SONALI, B., KAVITHA, K., PATIL, S.R., SUNITHA, G., PUTTY, K., REDDY, GH., REDDY, Y.H., HEGDE, N.R., RAO, P.P. Molecular typing of bluetongue viruses isolated over a decade in South India. **Transboundary and Emerging Disease**: doi: 10.1111/tbed.12320. 2015.

RIET-CORREA, F., MOOJEN, V., ROEHE, P.M., WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 26, n. 2, p.323-332. 1996.

ROY, P. 2007. Orbiviruses. In: Fields **Virology**. FIELDS, B.N., KNIPE D.M. & HOWLEY P.M. (Eds.). 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 1976p.

RUSSELL, H., O'TOOLE, D.T., BARDSLEY, K., DAVIS, W.C., ELLIS, J.A. Comparative effects of bluetongue virus infection of ovine and bovine endothelial cells. **Veterinary Pathology**. Washington, v. 33, n. 3, p.319-331. 1996.

SABAGHAN, M., BORUJENI, M.P., SHAPOURI, M.R.S.A., RASOOLI, A., NOROUZI, M., SAMIMI, S., MANSOURI, S. Seroprevalence of bluetongue in sheep in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran. **Veterinary Research Forum**. Úmia, v. 5, n. 4, p.325-328. 2014.

SAEGERMAN, C., BOLKAERTS, B., BARICALLA, C., RAES, M., WIGGERS, L., LEEUW, I., VANDENBUSSCHE, F., ZIMMER, J.Y., HAUBRUGE, E., CASSART, D., DE CLERCQ, K., KIRSCHVINK, N. The impact of naturally-occurring, transplacental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. **The Veterinary Journal**. London, v. 187, n. 1, p. 72-80. 2011.

SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J., PLEGUEZUELOS, F.J., PÉREZ DE DIEGO, A.C., GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C., SÁNCHEZ-VIZXAÍNO, J.M., CERÓN, J.J., TECLES, F., GARFIA, B., PEDRERA, M. Comparative study of clinical courses, gross lesions, acute phase response and coagulation disorders in sheep inoculated with bluetongue virus serotype 1 and 8. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 166, n. 1-2, p.184-194. 2013.

SANTMAN-BERENDS, I.M.G.A., VAN WUIJCKHUISE, L.V., VELLEMA, P., VAN RIJN, P.A. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 virus in Dutch dairy herds in 2007. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, p.31. 2010.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE. Possible use of vaccination against bluetongue in Europe. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. 1-27p. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out.47_en.pdf>. Acessado em: 13 de janeiro de 2015.

SPREULL, J. Malarial Catarrhal Fever (Bluetongue) of Sheep in South Africa: doi:10.1016/S0368-1742(05)80073-6.1905.

TABACHNICK, W.J. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. **Veterinaria Italiana**. Teramo, v. 40, n 3, p.144-150. 2004.

WORWA, G., THÜR, B., GRIOT, C., HOFMANN, M., MACLACHLAN, J.N., CHAIGNAT, V. Bluetongue disease in Swiss sheep breeds: clinical signs after experimental infection with bluetongue virus serotype 8. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**. Bern, v 150, n. 10, p. 491-498. 2008.

WILSON, A., DARPEL, K., MELLOR, P.S. Where does bluetongue virus sleep in the winter? **Plos biology**. California, v. 6, n. 8, p.1612-1617. 2008.

WRIGHT, I.M. 2014. Serological and genetic characterisation of putative new serotype of bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus isolated from an alpaca. Dissertation for the degree magister scientiae in biochemistry. Disponível em: <<http://dspace.nwu.ac.za/handle/10394/11044>>. Acessado em: 15 de janeiro de 2015.

ZACHARY, J.F. 2012. Mechanisms of Microbial Infections. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. ZACHARY, J.F. AND MCGAVIN, M.D. (Eds.). 5^a ed. Elsevier: St. Louis. 147-241p.

ZIENTARA, S., SAILLEAU, C., VIAROUGE, C., HÖPER, D., BEER, M., JENCKEL, M., HOFFMANN, B., ROMEY, A., BAKKALI-KASSIMI, L., FABLET, A., VITOUR, D., BRÉARD, E. Novel Bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 20, n. 12, p.2123-2125. 2014.

ZIENTARA, S., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Control of bluetongue in Europe. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p.33-37. 2013.