



DANIEL ARRAIS BIIHRER

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS
DE MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2017

DANIEL ARRAIS BIIHRER

INQUÉRITO SOROLÓGICO DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DE MINAS GERAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para a obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

LAVRAS - MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Biihrer, Daniel Arrais.

Inquérito sorológico da língua azul em ovinos de Minas Gerais
/ Daniel Arrais Biihrer. - 2017.

32 p.

Orientador(a): Djeison Lutier Raymundo.

Coorientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Orbivírus. 2. Diagnóstico. 3. Ovinocultura. I. Raymundo,
Djeison Lutier. II. Varaschin, Mary Suzan. III. Título.

DANIEL ARRAIS BIIHRER

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DE MINAS GERAIS
SEROLOGICAL SURVEY OF BLUETONGUE IN SHEEP FROM MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 07 de Fevereiro de 2017

Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Dr. Antônio de Pádua Lima UNILAVRAS

Dra. Mary Suzan Varaschin UFLA

Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters UFLA

Dra. Lidiane Orlandi UNILAVRAS

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

LAVRAS - MG

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, em especial meus pais, Marli e Carlos que me apoiaram em cada momento de minha vida até aqui. Também agradeço de maneira especial minha avó Zélia pelas visitas e apoio. Sei ainda que toda minha família sempre esteve presente nas orações nas quais fui apresentado, e sou imensamente grato à todos por isso.

Aos meus mestres que me ensinaram muito mais do que conhecimentos sobre a Veterinária, me ensinaram valores importantes de integridade e responsabilidade. À cada um agradeço e desejo que mais alunos tenham a oportunidade de aprender com cada um de vocês: Djeison, meu orientador que sempre me demonstrou paciência e apoio, Mary pelas “puxadas de orelha” que sempre me estimularam à melhorar, Flademir pelos excepcionais conhecimentos e experiência em Patologia e Angélica pelo exemplo em postura e dedicação ao trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório que tornaram cada passo dessa jornada menos doloroso e, na verdade, fizeram com que na maior parte do tempo seja uma jornada de sorrisos e companheirismo, em especial ao Talison, sem ele não haveria força de vontade em mim pra continuar a buscar meus sonhos.

Agradeço ao apoio e parcerias com a professora Zélia Lobato do Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, ao pessoal do Laboratório de Virose de Bovinos do Instituto Biológico de São Paulo e às instituições de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG. Sem eles esse trabalho não seria possível.

RESUMO

A língua azul é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete ruminantes domésticos e silvestres, causada por um vírus do gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*, transmitida por artrópodes vetores do gênero *Culicoides*. Existem relatos da doença clínica em ovinos ocorridos em diversos estados do Brasil, incluindo Minas Gerais. O presente estudo teve como objetivo ser o primeiro trabalho a realizar um inquérito sorológico da língua azul em rebanhos ovinos nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais. Foram coletadas amostras de soro de ovinos diferentes propriedades, nas quais também foram aplicados questionários epidemiológicos. As amostras de soro foram submetidas aos testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ensaio de imunoadsorção enzimática por competição (cELISA). Os dados epidemiológicos foram relacionados com os resultados de soropositividade dos animais por meio de análises estatísticas. Ao todo 303 amostras de soro foram submetidas ao IDGA e cELISA. Dessas amostras, 164 (54,13%) foram positivas na técnica de IDGA e 171 (56,44%) positivas na técnica de cELISA, havendo concordância quase perfeita entre as técnicas (índice kappa = 0,887). Em todas as propriedades visitadas, foram encontrados animais positivos no rebanho. Animais adquiridos de propriedades das Mesorregiões estudada, tiveram mais chances de serem positivos nos testes de IDGA e cELISA do que animais adquiridos de propriedades de outras Regiões do Brasil ($p < 0,001$), demonstrando que o vírus circula de maneira importante nas Mesorregiões estudadas. Como esperado em uma região de grande circulação do vírus, maior parte dos animais positivos nos exames sorológicos não apresentavam sinais clínicos. Esses resultados sugerem que o vírus da língua azul encontra-se disseminado nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais causando, predominantemente, infecções subclínicas.

Palavras-chave: Orbivirus. Diagnóstico. Sorologia. Ovinocultura.

ABSTRACT

Bluetongue is an infectious, non-contagious disease that affects domestic and wild ruminants, caused by a virus from *Orbivirus* genus, *Reoviridae* family, transmitted by arthropod vectors of the *Culicoides* genus. There are reports of clinical disease in sheep that occurred in several states of Brazil, including Minas Gerais. This paper aims to be the first serological survey of bluetongue in sheep from the Meso-regions of Campo das Vertentes and South and Southeast of Minas Gerais. Samples were collected from sheep from different properties, in which epidemiological questionnaires were also applied. The serum samples were submitted to Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (cELISA). Epidemiological data were related to positive animals by statistical analyzes. A total of 303 serum samples were submitted AGID and cELISA. In these samples, 164 (54.13%) were positive in the AGID technique and 171 (56.44%) positive in the cELISA technique, with almost perfect agreement between the techniques (kappa index = 0.887). In all visited properties positive animals have been found in the herd. Animals acquired from properties of the studied Meso-regions were more likely to be positive in IDGA and cELISA tests than animals acquired from properties in other regions of Brazil ($p < 0.001$), showing that the virus circulates in an important way on the studied Meso-regions. As expected in a region in with increased circulation of the virus, most of the animals positives in the serological tests didn't show any clinical signs. These results suggests that bluetongue virus is widespread in the Meso-regions of Campo das Vertentes and South and Southeast of Minas Gerais, mostly causing subclinical infections.

Keywords: Orbivirus. Diagnosis. Serology. Sheep farming.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos ovinos positivos nos testes de cELISA e IDGA contra o BTV, por propriedade, a partir de soros ovinos coletados nas Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	23
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Inquéritos sorológicos para o vírus da LA efetuados no Brasil no período de 1980 a 2009 segundo autor, ano, Estado(s), técnica empregada, espécie animal e proporção de animais reagentes (adaptada de BERNARDES, 2011).....	12
Quadro 2 – Surtos clínicos da LA no Brasil de 2001 até 2016, demonstrando estados, ano e espécies acometidas.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes no exame de cELISA para detecção de anticorpos contra o BTV, de acordo com as propriedades das Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	22
Tabela 2 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes no exame de IDGA para detecção de anticorpos contra o BTV, de acordo com as propriedades das Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	22
Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos entre as técnicas de cELISA e IDGA contra o BTV de 303 soros ovinos coletados nas Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	23
Tabela 4 – Ovinos positivos e negativos nas técnicas de cELISA e IDGA, considerando região de origem de 303 ovinos coletados nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivos gerais	9
2.2 Objetivos específicos	9
3 REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 Etiologia	10
3.2 Epidemiologia	11
3.3 Patogenia	13
3.4 Sinais clínicos	14
3.5 Achados de Necropsia e Histopatologia	15
3.6 Diagnóstico	16
3.7 Controle e profilaxia	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Locais de coleta de amostras	19
4.2 Aplicação do questionário epidemiológico	19
4.3 Pesquisa de anticorpos contra o BTV em amostras de soro	20
4.3.1 cELISA	20
4.3.2 IDGA	21
4.4 Análises estatísticas	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO A – MODELO DE QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	32

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos estão entre os primeiros animais domesticados pelo homem, utilizados para produção de carne, leite e lã. A ovinocultura encontra-se difundida em praticamente todos os continentes devido ao poder de adaptação da espécie em condições climáticas distintas. A produção também é intensiva na América do Sul, onde são encontrados principalmente ovinos de dupla aptidão, que produzem lã e carne de qualidade para exportação (VIANA, 2008).

O Brasil possui um rebanho ovino com mais de 17,6 milhões de animais, distribuídos, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (22,6%), seguido dos estados da Bahia (17,4%) e do Ceará (12,1%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014). Com relação à Região Sudeste, o rebanho ovino é de aproximadamente 768 mil cabeças, sendo que Minas Gerais é o segundo estado com o maior número de animais (221.439) (IBGE, 2014). No Sul do Brasil, a criação é voltada para produção de lã, a qual corresponde a uma produção média anual de 11 milhões de toneladas (IBGE, 2014), enquanto na Região Nordeste, a finalidade do rebanho é para produção de carne, obtida por ovinos deslanados com alta rusticidade (BORGES; SILVA; VIANA, 2004; VIANA, 2008).

Apesar do crescimento da produção de carne nos últimos anos, o Brasil ainda importa, para abastecimento do mercado consumidor, cerca de 90% da carne ovina do Uruguai (VIANA, 2008). Para garantir a participação do Brasil no mercado internacional deste produto, bem como reduzir as importações de carne ovina, é fundamental a aplicação de medidas sanitárias que garantam a redução das taxas de mortalidade encontradas em grande parte dos rebanhos ovinos nacionais (GUIMARÃES et al., 2009).

A Língua Azul (LA), conhecida mundialmente como *Bluetongue* (BT), é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete ruminantes domésticos e silvestres (MACLACHLAN et al., 2009). As perdas causadas pela LA se devem às restrições na importação e na exportação de animais e de seu material genético, além dos transtornos reprodutivos associados à infecção (COSTA et al., 2006).

A doença foi identificada pela primeira vez no continente africano, no final do século XVIII, com o nome de “epizootia catarral das ovelhas”, enquanto a infecção pelo Vírus da Língua Azul (BTV – do inglês *Bluetongue virus*) (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS – ICTV, 2015) foi descrita pela primeira vez em 1902 (MACLACHLAN, 2011; ROY, 2007).

Ao longo dos anos a infecção foi relatada pela primeira vez em outros continentes, como na Europa em 1924 (ROY, 2007) e na América em 1980 nos Estados Unidos, em um bovino

oriundo do Brasil que se encontrava em quarentena (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982). Entretanto, apenas em 2001 foi confirmado o primeiro surto da doença em ovinos e caprinos no Brasil no estado do Paraná (CLAVIJO et al., 2002).

A partir do diagnóstico do BTV, sorotipo BTV-4, em doença clínica em um rebanho ovino na Mesorregião do Campo das Vertentes em Minas Gerais (LIMA et al., 2016), percebeu-se que o vírus está circulando em ovinos no estado. Entretanto não se conhecia até então dados sorológicos sobre a presença do vírus nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais, sendo este o primeiro levantamento sorológico do BTV nessas mesorregiões.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como principal objetivo realizar um inquérito sorológico buscando encontrar anticorpos contra o BTV em rebanhos ovinos das Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais, além de obter mais informações sobre sinais clínicos e dados epidemiológicos nas propriedades visitadas.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar um estudo sorológico da infecção pelo BTV em rebanhos ovinos de propriedades das Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais, próximas ao município de Lavras, usando as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e de ensaio de imunoabsorção enzimática por competição (cELISA).

2. Estabelecer a concordância das técnicas de IDGA e cELISA para o diagnóstico sorológico do BTV por meio de testes estatísticos.

3. Estabelecer as principais manifestações clínicas apresentadas pelos animais nos rebanhos visitados, observação dos animais nas propriedades, aplicação de questionário epidemiológico e realizar análises estatísticas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia

A LA é causada por um vírus do gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*, transmitida por artrópodes vetores do gênero *Culicoides* (MACLACHLAN, 2011). Atualmente são reconhecidos 26 sorotipos de BTV em todo mundo (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS – OIE, 2016), agrupados de acordo com sua reatividade sorológica.

Os vírions do BTV medem cerca de 65 a 75 nm, não possuem envelope lipídico e as proteínas que compõem a partícula viral estão dispostas em camadas concêntricas, com simetria icosaédrica. O genoma do BTV é formado por 10 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) que codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e quatro proteínas não estruturais (NS1 a NS4) (MOHL; ROY, 2014).

A VP7 é considerada a principal determinante do sorotipo. Mesmo fazendo parte da estrutura do núcleo sabe-se que ela está exposta em partes da superfície dos vírions, sendo assim capaz de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (NOAD; ROY, 2009). A VP3 está associada com a integridade estrutural do núcleo viral, sendo altamente conservada entre os diferentes sorotipos do vírus (MERTENS et al., 2004).

A VP5 é associada com a penetração do vírion na membrana do endossomo ao induzir instabilidade e permeabilidade de membranas, sendo responsável pela liberação do núcleo viral no citoplasma celular. A proteína VP2, integrante do capsídeo, apresenta atividades de hemaglutinação, hemadsorção e estimula a produção de anticorpos neutralizantes, sendo extremamente variável entre os sorotipos do BTV (NOAD; ROY, 2009).

Acredita-se que a proteína VP1 seja a RNA polimerase viral responsável pela transcrição e pela replicação do genoma durante a replicação viral nas células do hospedeiro, fazendo parte do complexo de transcriptase junto às proteínas VP4 e VP6 (PATEL; ROY, 2014).

As proteínas não estruturais NS1, NS2, NS3 e NS4 são produzidas durante a replicação, e estão envolvidas nos processos de replicação, maturação e saída dos vírions das células infectadas do hospedeiro. Os genes que codificam essas proteínas são altamente conservados entre os diferentes sorotipos do BTV, demonstrando sua importância no processo de replicação do vírus (RATINIER et al., 2011).

3.2 Epidemiologia

O BTV é capaz de infectar vários ruminantes domésticos e selvagens, incluindo ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos e cervídeos. A forma clínica da doença é mais comumente observada nos ovinos e nos cervídeos (RUIZ-FONS et al., 2014; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013). Entretanto, bovinos e caprinos são importantes epidemiologicamente, pois servem como reservatórios do vírus por períodos prolongados (MACLACHLAN et al., 2009).

O vírus é transmitido por mosquitos hematófagos do gênero *Culicoides*, especialmente nas épocas quentes e úmidas do ano, as quais favorecem a proliferação desses vetores. A fase de viremia é variável, podendo persistir por cerca de 50 dias nos ovinos, em caprinos 28 a 41 dias e em bovinos cerca de 100 dias. Esta fase caracteriza-se pela associação do vírus com células sanguíneas, principalmente monócitos, linfócitos e hemácias (MACLACHLAN et al., 2009; POZZO; SAEGERMAN; THIRY, 2009).

A LA era eventualmente diagnosticada em alguns países da costa do mar mediterrâneo. No entanto, a doença foi reintroduzida em diversos países europeus em 2006, incluindo Alemanha e Holanda, ocasionando grande repercussão. Recentemente, em 2014, um surto de grandes proporções ocorreu na Grécia e em outros países do Mediterrâneo, como Turquia, renovando as discussões e preocupações com a LA na Europa (KYRIAKIS et al., 2015).

No Brasil, a primeira evidência de anticorpos contra o BTV foi relatada em bovinos e ovinos no estado de São Paulo (SILVA, 1978). Os levantamentos sorológicos no Brasil têm demonstrado o vírus em todo o país e em diferentes proporções. Os dados podem ser vistos no Quadro 1, adaptado de Bernardes (2011).

Quadro 1 - Inquéritos sorológicos para o vírus da LA efetuados no Brasil no período de 1980 a 2009 segundo autor, ano, Estado(s), técnica empregada, espécie animal e proporção de animais reagentes (adaptada de BERNARDES, 2011)

Autores	Ano	Estado	% de Reagentes/Amostragem	Técnica utilizada	Espécie
Moreira et al.	1980	MG	74(427/577)	IDGA	Bovina
Cunha et al.	1982	RJ	41 (227/553)	IDGA	Bovina
Abreu	1982	RR	16 (236/1472)	IDGA	Bovina
		AM	26 (94/360)	IDGA	Bovina
		PA	26 (94/360)	IDGA	Bovina
		PA	33 (119/360)	IDGA	Bovina
		PA	21 (86/360)	IDGA	Bovina
		PA	21 (86/360)	IDGA	Bovina
Silva et al.	1988	MG	6 (20/340)	IDGA	Caprina
Cunha et al.	1987	PR	20 (21/106)	IDGA	Bovina
		SP	54 (116/2140)	IDGA	Bovina
		SC	37 (64/174)	IDGA	Bovina
		RS	1,2 (5/409)	IDGA	Bovina
Cunha et al.	1988	RJ	44 (261/593)	IDGA	Caprina
		RJ	24 (8/33)	IDGA	Ovina
Castro et al.	1992	MG	76 (343/451)	IDGA	Bovina
Arita et al.	1992	SP	53 (38/72)	IDGA	Ovina
Costa	2000	RS	0,15 (2/1341)	IDGA	Ovina
Costa	2000	RS	0,6 (8/1272)	IDGA	Bovina
Lobato et al.	2001	MG	42 (623/ 1484)	IDGA	Caprina
		MG	65 (408/628)	IDGA	Ovina
Silva	2002	CE	31 (578/1865)	IDGA	Caprina
Leander	2002	MG	58,6 (338/577)	IDGA	Ovina
		MG	41,2 (533/1295)	IDGA	Caprina
Nogueira	2007	SP	65 (65/1002)	IDGA	Ovina
Alves	2008	PB	4,1 (27/506)	IDGA	Ovina
Venditti	2009	SP	13,75 (72/538)	IDGA	Ovina
			19,33 (104/538)	cELISA	Ovina

Diversos levantamentos sorológicos realizados em rebanhos bovinos, ovinos e caprinos em diferentes estados do Brasil demonstraram que as Regiões Sudeste (KONRAD et al., 2004; LOBATO et al. 2001), Centro-Oeste (DORNELES et al., 2012; TOMICH et al., 2009) e Norte (ABREU, 1982) apresentam alto número de animais soropositivos, enquanto que as Regiões Sul (COSTA et al., 2006) e Nordeste (MELO et al., 2000; SILVA, 2002; SOUZA et al., 2010) apresentam índices de soroprevalência muito baixos. As baixas taxas de soropositividade observadas nas Regiões Nordeste e Sul podem estar associados ao clima desfavorável do semi-árido e de invernos mais rigorosos destas duas regiões, o que dificultaria a multiplicação ou manutenção do vetor (COSTA et al., 2006; MELO et al., 2000). Entretanto, como observado na tabela, a maior parte dos estudos são antigos e não abrangem todas as regiões dos estados,

podendo esses valores serem subestimados em regiões como o Nordeste, sendo necessários novos estudos em grande parte do Brasil.

No estado de Minas Gerais foram realizados estudo sorológicos nas Mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri de Minas Gerais, com o intuito de verificar a distribuição e a prevalência da infecção pelo BTV em diferentes espécies animais. Em bovinos observou-se positividade em mais de 59% dos animais analisados (KONRAD et al., 2004), em caprinos dois trabalhos demonstraram soropositividade em mais de 40% dos animais testados (LOBATO et al., 2001; LAENDER, 2002) e já em ovinos a soropositividade ficou em torno de 58,6% (LEANDER, 2002) e 61% (LOBATO et al., 2001) dos animais. Contudo, nas Mesorregiões Sul e Sudoeste e Campo das Vertentes, ainda não existem relatos que demonstram a ocorrência de anticorpos contra o BTV em ruminantes.

Em uma ampla revisão de Lobato e colaboradores (2015) sobre a distribuição do BTV na América do Sul, os surtos clínicos da doença no Brasil são elencados. Somado ao trabalho de Lima e colaboradores (2016), ao todo foram relatados 15 surtos da LA no Brasil. Esses dados são evidenciados no Quadro 2.

Quadro 2 – Surtos clínicos da LA no Brasil de 2001 até 2016, demonstrando estados, ano e espécies acometidas.

Estado	Ano	Espécie
Paraná	2001	Ovinos e Caprinos
Paraná (3 surtos)	2002	Ovinos e Caprinos
Rio Grande do Sul (2 surtos)	2009	Ovinos
Rio de Janeiro	2013	Ovinos
Rio Grande do Sul (7 surtos)	2014	Ovinos
Minas Gerais	2014	Ovinos

3.3 Patogenia

A replicação viral ocorre inicialmente no local da picada do inseto vetor, principalmente em células endoteliais do sistema vascular e em células do sistema linforreticular (MACLACHLAN, 2011). A fase de viremia é caracterizada pela associação do vírus às células sanguíneas, seguida de sua disseminação para outros tecidos, como linfonodos, baço e medula óssea (RIET-CORREA, 2007). Nesses tecidos, o vírus se replica no sistema microvascular, especialmente no epitélio bucal, levando a alterações patológicas características da doença. Diversos órgãos podem ser acometidos, incluindo pulmões, baço, coração, rim e bexiga.

Adicionalmente, o vírus, de forma indireta, induz a liberação de mediadores vasoativos e inflamatórios pelo hospedeiro (MACLACHLAN et al., 2009).

As alterações celulares são caracterizadas por degeneração e necrose, nas quais são observadas vacuolizações citoplasmáticas, tumefação celular e alterações nucleares como picnose e cariorrexe (RIET-CORREA, 2007). O endotélio apresenta-se hiperplásico, podendo levar à oclusão vascular e estase sanguínea. Eventualmente, podem ser encontradas alterações secundárias à lesão vascular, como hipóxia, edema e hemorragia (GUIMARÃES, 2015; LIMA et al., 2016).

3.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da LA são manifestados de forma distinta entre as espécies de ruminantes. Apesar de a infecção ser subclínica na maioria dos casos, o quadro clínico é mais pronunciado na espécie ovina, embora possam ocorrer manifestações clínicas eventuais em bovinos e caprinos (RUIZ-FONS et al., 2014; SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2013). Nos ovinos, o período de incubação varia entre cinco e dez dias, já o curso da doença pode variar de 5 a 15 dias, podendo haver recuperação dos animais (ANTONIASSI et al., 2010). Na forma superaguda, os animais podem apresentar dispneia como resultado do edema pulmonar e, após sete dias de infecção, vir a óbito devido à asfixia. Nos casos crônicos, o óbito pode ocorrer secundariamente à pneumonia causada por bactérias oportunistas, principalmente *Pasteurella* spp. (LIMA et al., 2016).

Os sinais clínicos iniciais são caracterizados por aumento da temperatura de 41 a 42° e elevação da frequência respiratória (GUIMARÃES, 2015). Outras manifestações clínicas incluem edema na face, particularmente na área submandibular; descarga nasal serosa a mucopurulenta, evoluindo para formação de crostas (LIMA et al., 2016). Pode ocorrer protrusão e edemaciação da língua e, eventualmente, ela pode ficar cianótica, característica responsável pela denominação da doença (ANTONIASSI et al, 2010). Ulcerações em mucosas e na língua propiciam a ocorrência de infecções secundárias e necrose, especialmente na porção superior do esôfago e na faringe, causando regurgitação e aspiração do conteúdo ruminal (GUIMARÃES, 2015).

Nas fases finais da infecção pode ser observada inflamação da banda coronária acima do casco, geralmente ocasionando laminite (RIET-CORREA, 2007). Sinais de claudicação e prostração, decorrentes das lesões musculares e podais, podem ser observados nos animais

acometidos. Ovinos infectados com o BTV também podem apresentar degeneração e necrose dos músculos esqueléticos do pescoço (LIMA et al., 2016). A infecção de ovelhas prenhes pode resultar em abortamentos em qualquer fase da gestação, natimortos, nascimento de cordeiros fracos ou com alterações teratogênicas e infertilidade (LOBATO, 1999).

Em bovinos, a infecção pelo BTV é comum, embora sejam raras as manifestações clínicas da doença. Quando presentes são caracterizadas por febre transitória, aumento da frequência respiratória e, ocasionalmente, lesões ulcerativas na mucosa oral e inflamação na região da coroa do casco (POZZO; SAEGERMAN; THIRY, 2009). A infecção em caprinos geralmente é branda ou inaparente, caracterizada por quadros febris ocasionais, baixos níveis de viremia de curta duração e hiperemia leve da conjuntiva e da mucosa nasal (RIET-CORREA, 2007).

Em ovinos, alguns diagnósticos diferenciais importantes que podem ser confundidos com a LA, são pododermatite, fotossensibilização, ectima contagioso, estomatite vesicular e febre aftosa (LOBATO, 1999). Nessa espécie, causas de aborto como brucelose, toxoplasmose, clamidiose, listeriose, salmonelose e leptospirose podem ser considerados diferenciais nesse tipo de manifestação (PEREIRA et al., 2013). Em bovinos, a rinotraqueíte infecciosa, febre catarral maligna, diarreia viral bovina estomatite vesicular, fotossensibilização e febre aftosa devem ser consideradas como diagnósticos diferenciais (POZZO; SAEGERMAN; THIRY, 2009).

3.5 Achados de Necropsia e Histopatologia

As alterações macroscópicas estão relacionadas com as lesões endoteliais, resultando em fragilidade vascular e, conseqüentemente, edema, congestão, hemorragias, inflamação e necrose (LIMA et al., 2016). Nos ovinos, áreas edemaciadas podem ser observadas na face e nas orelhas, além de exsudato nas narinas. Comumente são observadas petéquias e lesões ulcerativas na cavidade oral e nas mucosas dos proventrículos, especialmente em papilas e pilares ruminais e pregas do retículo (ANTONIASSI, et al., 2010; GUIMARÃES, 2015). Hiperemia, edema e petéquias também podem ser observados nas mucosas da cavidade nasal, bem como em faringe, traqueia e pulmões (LIMA et al., 2016). Em casos fatais da doença, os pulmões apresentam-se severamente hiperêmicos e edemaciados associados com espuma na traqueia e hidrotórax. Pneumonia aspirativa é uma alteração ocasionalmente encontrada na

necropsia, atribuída a mionecrose esofágica, associada à dilatação do esôfago e acúmulo de alimento na luz do órgão (LIMA et al., 2016).

Macroscopicamente, são observadas petéquias, equimoses e edema no tecido conjuntivo intermuscular, particularmente nos músculos do pescoço e na região torácica dorsal (ANTONIASSI, et al., 2010). Áreas de hemorragia também são encontradas no coração, especialmente nos músculos papilares. Uma alteração macroscópica característica de infecção pelo BTV em ovinos é a hemorragia na base da artéria pulmonar e é referida como uma lesão patognomônica da doença. (ANTONIASSI, et al., 2010; GUIMARÃES, 2015; LIMA et al., 2016).

Ao exame microscópico das lesões de mucosa são observados infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração e necrose de células epiteliais. As alterações encontradas nos músculos são compostas por necrose hialina e mineralização de fibras musculares individuais, associadas a edema e hemorragia intermuscular (GUIMARÃES, 2015; LIMA et al., 2016). Em casos de pneumonia aspirativa, as alterações pulmonares encontradas incluem infiltrado inflamatório neutrofílico na luz de alvéolos, bronquíolos e brônquios, associado à material vegetal e estruturas compatíveis com bactérias na luz de brônquios (LIMA et al., 2016).

3.6 Diagnóstico

A suspeita clínica de LA em ruminantes, especialmente ovinos, é baseada na manifestação clínica característica da doença, principalmente em épocas do ano favoráveis aos vetores ou quando são introduzidos animais em áreas endêmicas (LAENDER, 2002). É importante considerar diagnósticos diferenciais, incluindo ectima contagioso, febre aftosa, fotossensibilização e pneumonias (RIET-CORREA, 2007). Em bovinos o diagnóstico clínico é difícil, pois a doença clínica é rara e quando ocorre pode confundir com doenças como febre aftosa, diarreia viral bovina, estomatite vesicular entre outras (BERNARDES, 2011).

A necropsia e o exame histopatológico são de extrema importância no diagnóstico da LA, uma vez que a maioria dos casos são subclínicos ou associados à outras doenças e a identificação das alterações macro e microscópicas podem direcionar o diagnóstico para a LA (LIMA et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio da coleta de sangue de forma amostral nos animais do rebanho (NOGUEIRA, 2008; VENDITTI, 2009). Na análise bioquímica, o

aumento nos níveis das enzimas creatina quinase e aspartato aminotransferase é indicativo de lesões musculares, que auxiliam na suspeita de LA (ANTONIASSI, et al., 2010).

Segundo recomendação da OIE, o diagnóstico laboratorial da LA pode ser obtido por métodos baseados no isolamento e na identificação do vírus e em testes sorológicos. Para detecção de anticorpos contra o BTV podem ser empregadas técnicas de ensaio de imunoadsorção enzimática por competição (cELISA), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), soroneutralização (SN) e fixação de complemento (LOBATO, 1999; OIE, 2016). Estes testes identificam a exposição dos animais ao vírus e servem, na maioria das vezes, como testes complementares ao diagnóstico clínico e patológico. (OIE, 2016).

O teste considerado mais conclusivo para o diagnóstico da LA é o isolamento viral. Amostras de sangue e tecidos dos animais acometidos são utilizados para inoculação intravenosa em ovos embrionados, seguida de cultivo em células BHK (*baby hamster kidney* – rins de hamsters filhotes). A identificação do BTV é realizada por imunofluorescência direta (IFD) e a tipificação sorológica pela técnica de soroneutralização (SN). Entretanto, o isolamento e cultivo celular do vírus, a partir de amostras clínicas, é bastante difícil.

O teste de IDGA era considerado um dos principais métodos utilizados para identificação de anticorpos contra o BTV em diferentes espécies de ruminantes. É considerado importante ferramenta para a vigilância epidemiológica da doença e para emissão de certificados de trânsito para rebanhos destinados à exportação (LOBATO, 1999; OIE, 2016). No entanto, reações cruzadas podem ocorrer com outros *Orbivirus*, como o vírus da doença hemorrágica epizootica dos cervídeos (DHE) (COSTA et al., 2006).

Atualmente, de acordo com recomendações da OIE, o cELISA é o método indireto de diagnóstico preferível ao IDGA. Isso se dá, pois o cELISA possui maior especificidade, não havendo reação cruzada com o vírus da DHE. (OIE, 2016). Além disso, já existem kits comerciais disponíveis e as indicações para o uso desse teste são as mesmas do IDGA.

Uma alternativa para o diagnóstico é a técnica da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) que detecta a presença do ácido nucléico viral em amostras clínicas (OIE, 2016). A RT-PCR consiste na amplificação de segmentos específicos contidos no genoma do BTV, que podem ainda ser sequenciados e comparados com sequências disponíveis em bancos de dados, como GeneBank (ANTONIASSI et al., 2010).

3.7 Controle e profilaxia

A introdução do BTV em uma determinada área pode advir do movimento de vetores infectados ou de hospedeiros vertebrados infectados, sejam estes animais selvagens em deslocamento ou por importação e exportação de animais domésticos. Dessa forma o controle deve ser baseado em ações integradas envolvendo o vetor, o hospedeiro e o ambiente (OIE, 2016).

Devido às características ambientais e biológicas do vetor, sua erradicação é difícil. Algumas opções seriam o uso de larvicidas e inseticidas, estabulação dos animais no final da tarde até o início da manhã e evitar pastagens úmidas baixas (OIE, 2016). Entretanto, tais medidas podem não ser eficientes dependendo da espécie do *Culicoides* da região em questão (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

Quanto ao hospedeiro, deve ser considerada principalmente a circulação segura de animais, limitando a propagação do vírus para regiões livres. Para isso, os animais devem ser testados e permanecer em quarentena para a detecção da infecção viral por meio de testes sorológicos (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

A vacinação de ovinos e de outros ruminantes suscetíveis já se provou ser o meio mais eficaz e prático contra a disseminação da LA (ZIENTARA; SANCHEZ-VIZCAINO, 2013). Não há evidências de que apenas o uso de repelentes e inseticidas (focados no vetor) alcance resultados a longo prazo no controle da LA, a menos que haja associação com outros métodos, como a imunização dos ruminantes (KYRIAKIS et al., 2015). Vacinas inativadas, usadas na Europa desde 2001, têm se mostrado seguras e efetivas para o controle da LA, tendo desempenhado um papel importante na supressão de surtos graves como o causado pelo sorotipo 8 entre os anos de 2006 e 2008 nesse continente (KYRIAKIS et al., 2015).

Em diversos locais do mundo, como na Europa e na África, o emprego de estratégias de vacinação é uma realidade, buscando prevenir ou limitar a doença a um nível mínimo (SOK et al., 2015). No Brasil, os dados sobre a ocorrência da doença clínica sempre foram considerados escassos, não justificando a utilização de vacinas (RIET-CORREA, 2007). Entretanto, surtos recentes já foram relatados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (BALARO et al., 2014; GUIMARÃES, 2015; LIMA et al., 2016)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de coleta de amostras

O presente trabalho está devidamente registrado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA (CEUA-UFLA) sob o número 023/2013.

A coleta de soro foi realizada em propriedades criadoras de ovinos nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais durante o período de agosto de 2015 a outubro de 2016. Em um levantamento inicial juntamente com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), obteve-se 22 propriedades que desenvolvem criação de ovinos localizadas nas regiões mais próximas do município de Lavras, possuindo criações entre 10 e 1.000 ovinos. Foram selecionadas as propriedades com maior número de animais adultos para a coleta das amostras de soro e, a partir do contato com os criadores, a coleta foi realizada em oito propriedades dos municípios de Santo Antônio do Amparo, São João del Rey, Nazareno, Ritópolis, Cambuquira, Soledade de Minas e 2 propriedades em Nepomuceno. Em cada propriedade foram coletadas amostras de pelo menos 30% do rebanho, ou de todo o rebanho quando o mesmo era inferior a 50 animais.

4.2 Aplicação do questionário epidemiológico

O questionário (Anexo A) foi aplicado nas propriedades na mesma ocasião da coleta dos soros. As perguntas abrangem os seguintes assuntos: tamanho da propriedade, sistema de criação de ovinos (intensivo, semi-intensivo ou extensivo), outras atividades desenvolvidas (criação de outras espécies animais, agricultura, etc.), raça criada na propriedade, número de animais, tempo da criação, origem dos animais (ovinos e outras espécies, se necessário), tipo de alimentação do rebanho, suplementação mineral, origem da água, sinais clínicos ou doenças frequentes na propriedade (artrite, pododermatite, sinais neurológicos, diarreia, linfadenite, mamite, ectima contagioso), causas de mortes diagnosticadas no rebanho, problemas reprodutivos, problemas respiratórios, endo e ectoparasito, além de medidas de manejo sanitário adotadas.

As perguntas escolhidas se basearam em dados da literatura que definem fatores de risco para a ocorrência da Língua Azul, além das principais doenças que acometem ovinos. No trabalho de Alves e colaboradores (2009), o tipo de criação intensiva é considerado um fator de

risco, pois aumentam as chances de transmissão do vírus pelo vetor artrópode. A criação de outras espécies animais, como bovinos e caprinos, aumenta as chances de transmissão do vírus, uma vez que essas espécies apresentam uma fase de viremia longa e funcionam como reservatório do vírus (MACLACHLAN et al., 2009).

Dentre as principais manifestações clínicas observadas nas diferentes criações de ovinos, que embasaram a formulação do questionário, destacam-se os abscessos cutâneos (relacionados à linfadenite caseosa); diarreia, edema submandibular e anemia (sugestivos de processos parasitários como hemoncose); abortos; alterações oculares; crostas ao redor de boca, narinas e orelhas (associadas ao ectima contagioso ou fotossensibilização) e mamites (ALENCAR et al., 2010).

4.3 Pesquisa de anticorpos contra o BTV em amostras de soro

A coleta das amostras foi realizada após contenção física dos animais, com retirada de sangue da veia jugular em tubos de coleta de sangue sem anticoagulantes. As amostras foram transportadas refrigeradas para a Universidade Federal de Lavras onde foram centrifugadas. O soro foi armazenado, em duplicata, em microtubos de 1,5ml e armazenado a -20°C até a realização dos exames.

As amostras de soro de cada animal foram então encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG e para o Laboratório de Viroses de Bovinos do Instituto Biológico de São Paulo, nos quais foram realizados, respectivamente, os exames de IDGA e cELISA, para a detecção de anticorpos contra o BTV.

4.3.1 cELISA

Para a realização do cELISA, foi utilizado o Kit comercial *Bluetongue Virus Antibody Test Kit VMRD®*, seguindo as instruções do fabricante. Em cada poço da placa foram colocados 25 µL do soro a ser testado, sendo deixados dois poços para controle negativo e dois para o controle positivo presente no kit, e então incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo, foi acrescentado 25 µL do conjugado anticorpo-peroxidase em cada poço e a placa foi incubada por mais 15 minutos em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com a solução de lavagem do kit seguida da adição de 50 µL da solução

substrato e mais 10 minutos de incubação. Foram então acrescidos 50 µL de solução de parada e logo em seguida as placas foram lidas em leitora de ELISA modelo *Thermo Labsystem Multiskan Ascent* com filtro de 620 nm para obtenção dos valores de densidade ótica (DO). As amostras foram consideradas positivas quando seus valores de DO correspondiam a menos de 50% da média dos valores de DO dos controles negativos, sendo utilizados dois desvios padrão (dois controles negativos e positivos).

4.3.2 IDGA

A IDGA foi utilizada para a pesquisa de anticorpos contra o BTV nas amostras de soros coletadas nas propriedades visitadas. Foi utilizada solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% e agarose na concentração final de 0,9% em água deionizada, depositada sobre placas circulares de acrílico. Em cada placa foram perfuradas sete rosetas contendo sete furos cada. O antígeno foi colocado no poço central e o soro controle positivo em outros três poços alternados na quantidade de 30 µL em cada poço. Nos poços restantes foram colocadas 30 µL das amostras de soro a serem testadas. As placas permaneceram em câmara úmida com sulfato de magnésio a 0,3% por 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram observadas com o auxílio de luz indireta em campo escuro. O antígeno foi produzido pela Escola de Veterinária da UFMG e o soro controle positivo era proveniente de um *pool* de soros positivos testados e titulados pela Escola de Veterinária da UFMG.

4.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Epi-info™ 7. A concordância entre as técnicas de cELISA e IDGA foi determinada com o uso do coeficiente kappa (THRUSFIELD, 2004). Para a associação dos resultados da sorologia dos ovinos com a origem dos animais, foi utilizado o teste de Qui-quadrado (THRUSFIELD, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 303 amostras de soro ovino coletadas, 171 (56,44%) foram positivas no exame de cELISA (Tabela 2). Já no teste de IDGA, 164 (54,13%) amostras foram positivas (Tabela 3). Os resultados obtidos dos exames sorológicos mostram que todas as propriedades foram

positivas, ou seja, o vírus não apenas está presente, mas já circulou em todas as propriedades visitadas nesse estudo. Isso mostra como o vírus está disseminado nas regiões próximas ao município de Lavras.

Tabela 1 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes no exame de cELISA para detecção de anticorpos contra o BTV, de acordo com as propriedades das Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.

Propriedades	Nº de Amostras Analisadas	Resultado cELISA		% de Positivos
		Positivo	Negativo	
P1	29	18	11	62,07%
P2	12	6	6	50,00%
P3	16	16	0	100,00%
P4	24	17	7	70,83%
P5	44	43	1	97,73%
P6	16	12	4	75,00%
P7	32	30	2	93,75%
P8	130	29	101	22,31%
Total	303	171	132	56,44%

Tabela 2 – Distribuição do número e porcentagem de ovinos reagentes no exame de IDGA para detecção de anticorpos contra o BTV, de acordo com as propriedades das Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.

Propriedades	Nº de Amostras Analisadas	Resultado IDGA		% de Positivos
		Positivo	Negativo	
P1	29	16	13	55,17%
P2	12	6	6	50,00%
P3	16	16	0	100,00%
P4	24	15	9	62,50%
P5	44	42	2	95,45%
P6	16	12	4	75,00%
P7	32	28	4	87,50%
P8	130	29	101	22,31%
Total	303	164	139	54,13%

Este trabalho foi o primeiro levantamento sorológico realizado nas regiões mais ao sul do estado de Minas Gerais (Campo das Vertentes e Região Sul e Sudoeste). Outros trabalhos

realizados no estado de Minas Gerais (LEANDER, 2002; LOBATO et al., 2001), também mostram que o vírus da Língua Azul pode ser encontrado em outras Mesorregiões do estado. Os valores de positividade encontrados nesse estudo (56,44% e 54,13%) são semelhantes aos observados em outros trabalhos realizados em Minas Gerais, nas Mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, sendo 58,6% por Laender (2002) e 65% por Lobato e colaboradores (2001).

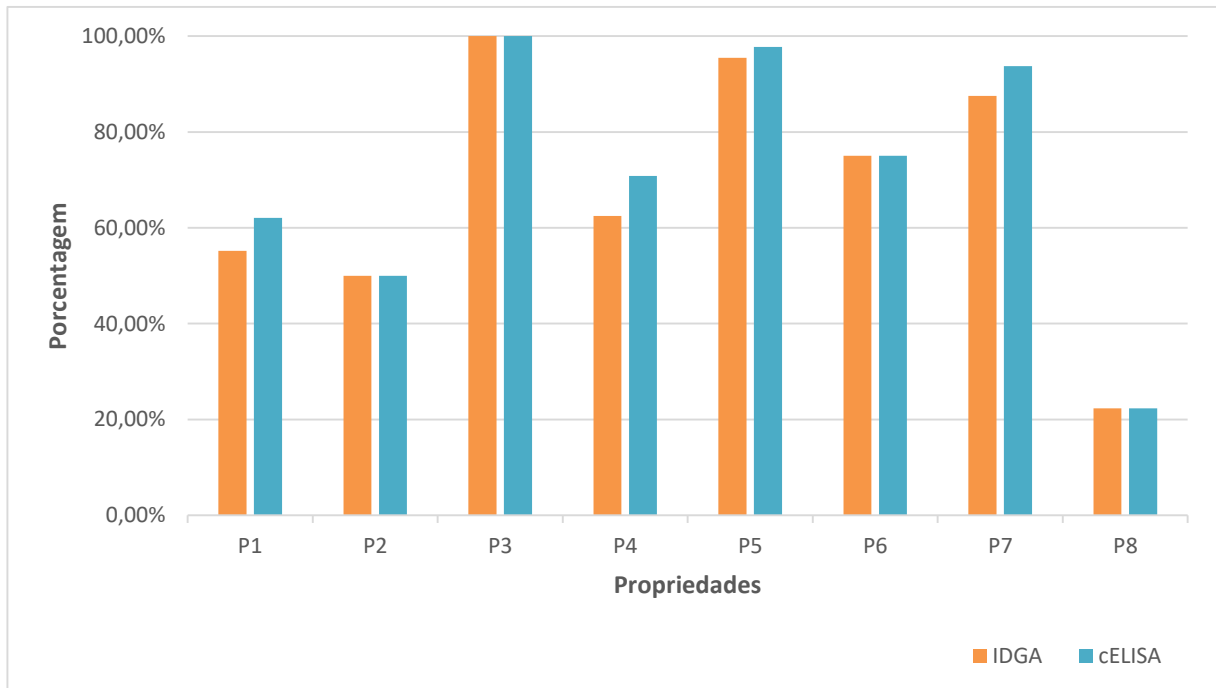
A ampla distribuição desse vírus no estado é destacada na literatura como uma característica da região Sudeste do Brasil. Nessa região, o clima e as chuvas esparsas ao longo do ano, garantem umidade e temperatura adequadas para proliferação do mosquito vetor (LEANDER, 2002). Além disso o amplo rebanho bovino da região também pode ser responsável pela manutenção do vírus, uma vez que essa espécie funciona como reservatório do mesmo. Trabalhos das regiões norte e nordeste de Minas Gerais mostram uma alta prevalência de anticorpos contra o BTV em bovinos (KONRAD et al., 2004), entretanto não há levantamentos sorológicos para o BTV nessa espécie nas regiões estudadas nesse trabalho, sendo necessário um novo levantamento.

A Tabela 4 representa a comparação entre os resultados obtidos em ambas as técnicas, cELISA e IDGA, considerando-se mesmas amostras para cada técnica. A comparação dos resultados positivos entre cELISA e IDGA dentro da mesma propriedade, pode mais facilmente ser observada no Gráfico 1.

Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos entre as técnicas de cELISA e IDGA contra o BTV de 303 soros ovinos coletados nas Mesorregiões de Campos das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.

	IDGA		Total	Kappa	IC 95%	P
	Positivo	Negativo				
cELISA	Positivo	159	171	0,887	0,774; 0,999	<0,001
	Negativo	5	132			
Total		164	303			

Gráfico 1 – Distribuição dos ovinos positivos nos testes de cELISA e IDGA contra o BTV, por propriedade, a partir de soros ovinos coletados em Minas Gerais.



O valor do índice kappa entre os resultados das técnicas de IDGA e cELISA demonstrou uma concordância quase perfeita (THRUSFIELD, 2004) entre as técnicas. Esse valor foi superior a outros valores encontrados na literatura, que demonstraram concordâncias moderada (VENDITTI, 2009) e substancial (NOGUEIRA, 2008). Apesar de a técnica de IDGA ser prescrita pela OIE desde 1982, a mesma recomenda o uso do cELISA para confirmação dos resultados positivos com o intuito de excluir possíveis reações cruzadas com outros *Orbivirus*, além de ser uma técnica mais sensível (OIE, 2016), entretanto, o valor de concordância mostra que a técnica de IDGA ainda pode ser usada como um importante método de vigilância soropidemiológica.

Nas oito propriedades visitadas, apenas duas (25%) possuíam acompanhamento veterinário. Cinco (62,5%) realizam criação concomitante de bovinos e uma (12,5%) também cria caprinos. O manejo reprodutivo realizado é a monta natural nas oito propriedades (100%). O sistema de criação é intensivo em três propriedades (37,5%), semi-intensivo em duas (25%) e extensivo em três (37,5%). Todos os animais amostrados já se encontravam em idade reprodutiva.

A oitava propriedade possuiu a menor quantidade de animais positivos (22,31%). O grande número de animais coletados se deu pelo grande rebanho dessa propriedade, que possuía ovinos criados de maneira intensiva para produção de leite. Essa criação possuía um grau mais avançado de tecnificação, higiene e possuía assistência veterinária para os ovinos, além de

ventiladores para circulação do ar no local de confinamento dos animais. A melhor higiene no local dos animais foi associada como fator de proteção contra a LA (ALVES et al., 2009), podendo estar relacionado com a menor quantidade de animais positivos nessa propriedade.

Quanto a origem dos animais adquiridos em cada propriedade, 141 animais (46,5%) eram provenientes de outros produtores da própria região (Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais), enquanto 162 animais (53,5%) foram adquiridos de Regiões do Paraná, Santa Catarina e Goiás. A Tabela 5 compara esses dados com a positividade dos animais nos testes de IDGA e cELISA.

Tabela 4 – Ovinos positivos e negativos nas técnicas de cELISA e IDGA, considerando região de origem de 303 ovinos coletados nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais.

	Origem dos Ovinos	Resultado sorológico			Odds ratio	IC (95%)	Valor de p*
		Positivo	Negativo	Total			
cELISA	Própria região	114	27	141	7,8	4,58; 13,2	<0,001
	Outras regiões	57	105	162			
IDGA	Própria região	107	34	141	5,8	3,51; 9,59	<0,001
	Outras regiões	57	105	162			

* Teste de qui-quadrado.

Como observado na Tabela 5, em ambos os exames, houve significância para animais provenientes da própria região possuírem mais chances de serem positivos do que animais adquiridos de outras regiões. Esse fato, além de reforçar a grande quantidade de animais positivos nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste de Minas Gerais, pode estar relacionado com a baixa positividade de animais nas Regiões Sul do Brasil (MELO et al., 2000; COSTA et al., 2006), as quais grande parte dos animais desse estudo tem como origem.

Entre os problemas sanitários relatados pelos proprietários e observados em alguns animais durante as visitas, as maiores queixas e achados foram de endoparasitas em seis propriedades (75%), linfadenite caseosa em quatro (50%), problemas locomotores e conjuntivite em três (37,5%), malformações e abortamentos em duas (25%), além de problemas relatados em apenas uma propriedade como fotossensibilização, mamites e problemas respiratórios. Essas manifestações podem estar associadas à LA, seja por meio de lesões causadas diretamente pelo vírus (abortos e

conjuntivites), seja por diminuição da competência imunológica dos animais, predispondo-os à outras enfermidades (COSTA et al., 2006; RIET-CORREA, 2007).

A maior parte do animais positivos não apresentavam qualquer tipo de sinal clínico no momento das coletas. No cELISA esse valor foi de 88,89% (152/171) e no IDGA 89,02% (146/164). De acordo com a literatura, apesar da espécie ovina ser conhecida por apresentar sinais mais severos, em regiões nas quais a prevalência sorológica do vírus é alta, os sinais clínicos são raros, sendo consideradas regiões endêmicas do vírus, o que dificulta a identificação da LA e aumenta as perdas econômicas por aumentar a susceptibilidade dos animais a outras doenças (LOBATO, 1999; VENDITTI, 2009).

6 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, pode se concluir que o Vírus da Língua Azul circula no rebanho ovino nas Mesorregiões de Campo das Vertentes e Sul e Sudoeste do estado de Minas Gerais em municípios próximos a Lavras/MG.

Todas as propriedades estudadas da região apresentam animais positivos para anticorpos contra o BTV, e muitas dessas propriedades apresentam valores altos de animais positivos nas técnicas de IDGA e cELISA, havendo concordância quase perfeita entre as técnicas.

A maior parte do animais positivos nas técnicas de diagnóstico sorológico não apresentavam qualquer tipo de sinal clínico no momento das coletas.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. P. et al. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 131-140, 2010.
- ALVES, F. A. L. et al. Soroprevalência e fatores de risco para a língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.484-489, 2009.
- ANTONIASSI, N. A. B. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p.1010-1016, 2010.
- ARADAIB, I. E. et al. A multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, p. 77–87, 2003.
- BALARO, M. F. A. et al. Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, p. 567-570, 2014.
- BERNARDES, N. T. C. G. **Soroprevalência da língua azul em bovinos do Estado de São Paulo, Brasil, 2001**. 59p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.) - Instituto Biológico São Paulo, São Paulo, 2011.
- BORGES, I.; SILVA, A. G. M.; VIANA, R. O. Agronegócio da ovinocultura: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA - ZOOTEC, UPIS – **Faculdades Integradas**, Brasília, p.1-22, 2004.
- CLAVIJO, A. et al. Isolation of Bluetongue Vírus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **Veterinary Record**, v.151, p.301-302, 2002.
- COSTA, J. R. R. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 273-275, 2006.
- DORNELES, E. M. S. et al. Prevalence of bluetongue vírus antibodies in sheep from Distrito Federal, Brazil. **Semina: Ciências Agrária**, v.33, n.4, p.1521-1524, 2012
- GUIMARÃES L. L. B. **Achados clínicos e patológicos de sete surtos de língua azul em ovinos em 2014 no Rio Grande do Sul, Brasil**. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- GUIMARÃES, A. S. et al. Características Zoossanitárias da ovinocultura em Minas Gerais. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas** v. 102, p. 34-39, 2009.
- GROOCOCK, C.; CAMPBELL, C. H. Isolation of an Exotic Serotype of Bluetongue Virus From Imported Cattle in Quarantine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v46, p160- 164, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Pecuária Municipal, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 15 Ago. 2015.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS – ICTV. **Virus Taxonomy: 2015 Release**. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> Acesso em: 09 jan. 2017.

KONRAD, P. A. et al. Anticorpos contra o vírus da Língua Azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.10, p.42-51, 2004.

KYRIAKIS, C. S. et al. Bluetongue in small ruminants: An opinionated review, with a brief appraisal of the 2014 outbreak of the disease in Greece and the south-east Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 181, p.66–74. 2015.

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

LIMA, P. A. et al. Diagnoses of Ovine Infection by the Serotype-4 Bluetongue Virus on Minas Gerais, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1. 2016.

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

LOBATO, Z. I. P. et al. Língua Azul em ovinos e caprinos na Região Mineira da SUDENE. In: **Congresso Brasileiro de Buiatria**, 4. Campo Grande, MS, 2001.

LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C.; MATOS, A. C. D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. **Veterinaria Italiana**, v. 15, n. 4, p. 253-262, 2015.

MACLACHLAN, N. J. et al. The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, p.1-16, 2009.

MACLACHLAN, N. J. Bluetong: History, Global Epidemiology and Pathogenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v 102, p 107-111, 2011.

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

MACLACHLAN, N. J. et al. The immune response of ruminant livestock to bluetongue virus: from type I interferon to antibody. **Virus Research**, v. 182, p. 71- 77, 2014.

MELO, C. B. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p. 29-20, 2000.

MERTENS, P. P. C. et al. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. **Veterinaria Italiana**. Terano, 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.

NOAD, R.; ROY, P. Bluetongue Vaccines. **Vaccine**, v27, p D86-D89, 2009.

NOGUEIRA, A. H. C. **Prevalência da Língua Azul em ovinos da região de Araçatuba – São Paulo, Brasil**. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia da UNESP, Araçatuba, São Paulo, 2008.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int>> Acesso em: 09 jan. 2017.

PATEL, A.; ROY, P. The molecular biology of Bluetongue vírus replication. **Virus Research**, v 182, p 5-20, 2014.

PEREIRA, M. P. et al. Estudo de casos de aborto em caprinos e ovinos no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 16, n. 1/2/3, p. 18-30, 2013,

POZZO, F. B.; SAEGERMAN, C.; THIRY, E. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 142-151, 2009.

RATINIER, M. et al. Identification and Characterization of a Novel Non-Structural Protein of Bluetongue Virus. **PLoS Pathog**, v. 7, n.12, 14p, 2011.

RIET-CORREA, F. Língua azul. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v. 1, p.169-173.

ROY, P. Bluetongue Virus: Dissection of the Polymerase Complex. **The Journal of General Virology**, v 89, p 1789-1804, 2007.

RUIZ-FONS, F. et al. The role of wildlife in bluetongue virus maintenance in Europe: Lessons learned after the natural infection in Spain. **Virus Research**, v. 182, p. 50-58, 2014.

SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J. et al. 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**, v. 166, p. 184-194, 2013.

SILVA, F. J. F. Relatório sobre estudos de ocorrência de Língua Azul em São Paulo. Brasília, 1978. Relatório da Comissão de Estudos – **Ministério da Agricultura**. Port. Min. nº150, 1978.

SILVA, M. X. **Soroprevalência da Língua Azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades no Ceará**. 83 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2002

- SOK, J. et al. Farmers' beliefs and voluntary vaccination schemes: Bluetongue in Dutch dairy cattle. **Food Policy**, v. 57, p. 40-49, 2015.
- SOUZA, T. S. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 419-427, 2010.
- TOMIC, R. G. P. et al.. Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e cervos campeiros no pantanal sul-mato-grossense. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1222-1226, 2009.
- THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, 2a ed., São Paulo, Roca, 2004, 558p.
- VENDITTI, L. L. R. **Infecção pelo vírus da língua azul em bovinos na região Sudeste do Brasil**. 77p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.) - Instituto Biológico São Paulo, São Paulo, 2009.
- VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v.4, p.1-9, 2008.
- ZIENTARA, S; SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. Control of bluetongue in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 165, p. 33-37, 2013.

ANEXO A – MODELO DE QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Proprietário:

Propriedade:

Endereço:

Localização:

Telefone:

E-mail:

1- Atividades desenvolvidas:

- Bovinos
- Equinos
- Caprinos
- Suínos
- Caninos
- Felinos
- Outros: _____

2- Tamanho da propriedade:

3- Sistema de criação:

- Intensivo
- Semi-intensivo
- Extensivo

4- Raças criadas:

5- Número de animais:

6- Origem dos animais:

7- Tempo de criação:

8- Alimentação:

9- Suplementação mineral:

10- Origem da água:

11- Forma de Reprodução:

12- Tempo entre partos:

13- Retorno ao cio:

14- Abortos:

15- Doenças ou sinais clínicos já observados na propriedade:

- Artrite:
- Pododermatite:
- Mamite:
- Linfadenite:
- Ectima contagioso:
- Diarreia (causa): _____
- Endoparasitos:
- Ectoparasitos:
- Sinais Neurológicos (quais): _____
- Pneumonias (causa): _____
- Hemoglobinúria/hematúria:
- Fotossensibilização:
- Outros: _____

16- Vacinas e medicações:

17- Acompanhamento veterinário:

- Sim
- Não

Motivo: _____

18- Animais mortos:

Número: _____

Diagnóstico:

- Sim
- Não

Qual: _____