



**PÂMELA APARECIDA DE LIMA**

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E  
LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS  
DA LÍNGUA AZUL (*Bluetongue*) EM OVINOS NO  
SUL DE MINAS GERAIS**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**PÂMELA APARECIDA DE LIMA**

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E LABORATORIAL DA INFECÇÃO  
PELO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (*Bluetongue*) EM OVINOS NO SUL 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 em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Djeison Lutier Raymundo

**LAVRAS - MG**

**2015**

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

Lima, Pâmela Aparecida.

Diagnóstico patológico e laboratorial da infecção pelo vírus da  
língua azul (*Bluetongue*) em ovinos no sul de Minas Gerais / Pâmela  
Aparecida Lima. – Lavras : UFLA, 2015.

46 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Djeison Lutier Raymundo.

Bibliografia.

1. Virus. 2. IDGA. 3. RT-PCR. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

**PÂMELA APARECIDA DE LIMA**

**DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO E LABORATORIAL DA INFECÇÃO  
PELO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (*Bluetongue*) EM OVINOS NO SUL 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 em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dr. Felipe Pierezan	UFMG
Dra. Mary Suzan Varaschin	UFLA

Dr. Djeison Lutier Raymundo  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2015**

*Dedico este trabalho aos meus pais Salvador e Ilza, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Vocês foram fundamentais para a realização deste sonho.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por iluminar meus caminhos e me guiar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ilza e Salvador, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando-me e me incentivando. Vocês são minha fortaleza e meu porto seguro; é impossível descrever o amor e carinho que sinto por vocês.

Agradeço aos meus amigos de Lavras e Pouso Alegre, por sempre acreditarem em mim. Em especial, aos meus queridos amigos Cris, Rafael, Daniel, Paulinha, Débora e Mário, pelo carinho e apoio durante todo esse tempo. Vocês me mostraram o significado da palavra amizade!

Aos meus mestres e professores da Patologia Veterinária, Mary, Flademir, Angélica e Josi, por terem me dado a honra de trabalhar e aprender com vocês. Obrigada, pelos incentivos e exemplos de conduta profissional.

Ao meu orientador, Djeison (DJ), pelos ensinamentos, paciência e confiança durante essa jornada.

A toda a equipe do Setor de Patologia Veterinária/UFLA, vocês foram fundamentais para a realização deste sonho.

Obrigada aos professores da banca que aceitaram o convite para participar da conclusão de uma etapa tão importante da minha vida. Às professoras Ana Paula Peconick (UFLA) e Mary Suzan Varaschin (UFLA), por estarem presentes desde o tempo da graduação na finalização dos meus trabalhos.

Aos professores Zélia Lobato (UFMG) e David Driemeier (UFRGS), pela colaboração na realização desse projeto.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro e toda a equipe da pós-graduação em Ciências Veterinárias.

## RESUMO GERAL

A Língua Azul (LA) é uma doença viral transmitida por vetores do gênero *Culicoides*. No Brasil, a identificação de anticorpos contra o vírus da Língua Azul tem sido realizada há mais de trinta anos, porém descrições de diagnóstico clinicopatológico da doença são escassos. Este estudo, descreve alterações clinicopatológicas da LA, em Minas Gerais. De um rebanho de 80 ovinos machos, 28 morreram. Apresentaram sinais clínicos de pneumonia, anemia e hipoproteinemia. Na necropsia, as principais alterações observadas foram consolidação pulmonar cranioventral e hemorragia na base da artéria pulmonar. Na histopatologia havia lesões pulmonares caracterizadas por broncopneumonia purulenta, além de necrose hialina e flocular em fibras musculares esqueléticas e cardíacas, associadas a infiltrado inflamatório mononuclear discreto entre fibras e ao redor de vasos sanguíneos. O diagnóstico de LA foi confirmado pelo isolamento e pela tipificação do vírus da LA sorotipo 4 em amostras de sangue e tecidos de ovinos do rebanho por meio da Transcriptase Reversa, seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e pela detecção de anticorpos contra o vírus da LA, no exame sorológico de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em amostras de soro de ovinos remanescentes no rebanho. Objetivou-se, neste trabalho descrever o primeiro caso de LA clínica em um rebanho ovino da região sul de Minas Gerais. Os achados de necropsia e histopatologia associados ao isolamento e tipificação viral permitiram a confirmação de LA em ovinos. A ocorrência de animais soropositivos para o vírus, demonstram que a doença pode estar ocorrendo de forma imperceptível nos rebanhos ovinos da região.

Palavras-chave: RT-PCR. Doenças virais. IDGA.

## GENERAL ABSTRACT

Bluetongue (BT) is a viral disease transmitted by vectors of the *Culicoides* genus. In Brazil, the identification of antibodies against the Bluetongue virus has been performed for over thirty years, however, clinicopathological diagnosis of the disease are scarce. This study describes clinicopathological changes of BT in Minas Gerais, Brazil. In a flock of 80 male sheep, 28 died. They showed clinical signs of pneumonia, anemia and hypoproteinemia. At necropsy, the main changes observed were cranioventral lung consolidation and hemorrhaging at the base of the pulmonary artery. The histological changes consisted of purulent bronchopneumonia as well as hyaline and flocculate necrosis in skeletal and cardiac muscle fibers, associated with moderate mononuclear inflammatory infiltrate between fibers and around blood vessels. The diagnosis of BT was confirmed by the isolation and typing of the BT virus serotype 4 in blood and tissue samples of sheep from the herd by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and by the detection of antibodies against the BT virus with the agar gel immune-diffusion (AGID) test on serum samples from the remaining sheep of the herd. In this study, we aimed at describing the first case of clinical BT in a sheep flock of southern Minas Gerais. The findings from necropsy and histopathology associated with viral isolation and typing allowed the confirmation of BT in sheep. The occurrence of animals seropositive to the virus show that the disease may be occurring imperceptibly in sheep herds of the region.

Keywords: RT-PCR. Viral diseases. AGID.



## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO

- Fig. 1.** Ovinos naturalmente infectados pelo vírus da Língua Azul. **(A)** Pulmões com consolidação cranioventral. **(B)** Área de hemorragia na base da artéria pulmonar. **(C)** Lesões ulcerativas na mucosa do palato duro. **(D)** Rúmen com áreas de ulceração e hemorragia. ....45
- Fig. 2.** Ovino. Língua Azul. **(A)** Pulmão. Necrose multifocal associada a infiltrado inflamatório neutrofílico e colônias bacterianas intralesionais. HE. Obj. 20 **(B)** Músculo estriado do esôfago com necrose hialina e floccular difusa de miofibras associada a infiltrado mononuclear discreto. HE. Obj. 20. ....46

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO DA DOENÇA DA LÍNGUA AZUL</b> ..	13
<b>2.1</b>	<b>Etiologia</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Patogenia</b> .....	16
<b>2.4</b>	<b>Sinais clínicos</b> .....	17
<b>2.5</b>	<b>Achados de necropsia e histopatologia</b> .....	19
<b>2.6</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	21
<b>2.6.1</b>	<b>Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)</b> .....	22
<b>2.6.2</b>	<b>Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia pela de Polimerase (RT-PCR)</b> .....	24
<b>2.7</b>	<b>Controle e profilaxia</b> .....	26
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	33
	<b>ARTIGO 1 Diagnóstico patológico e laboratorial da infecção pelo vírus da língua azul em ovinos</b> .....	33

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

Os ovinos estão entre os primeiros animais domesticados pelo homem, utilizados para a produção de carne, leite e lã. A ovinocultura encontra-se disseminada em praticamente todos os continentes, em função do poder de adaptação da espécie em condições climáticas distintas. Os maiores rebanhos estão localizados em países pertencentes aos continentes Ásia, África e Oceania. A Nova Zelândia e a Austrália são os principais países exportadores de carne e lã e possuem criações com alta produtividade. A produção também é intensiva na América do Sul, onde são encontrados, principalmente, ovinos de raças mistas, que produzem lã e carne de qualidade para exportação (VIANA, 2008).

De acordo com o IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013), o Brasil possui um efetivo rebanho ovino de 16.789 milhões de animais, sendo o maior rebanho o da região Nordeste, com 9.325.885 ovinos, seguido pelas regiões Sul (5.042.222), Centro-Oeste (1.078.316), Sudeste (744.426) e Norte (598.643). Minas Gerais é o segundo estado da Região Sudeste com maior número de animais (225.955 mil) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

No Brasil, as tendências para o mercado ovino têm se mostrado altamente viáveis e promissoras (BORGES; SILVA; VIANA, 2004; VIANA, 2008). Segundo a FAO (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO, 2007), nos próximos anos estima-se um crescimento anual de 2,1% na produção de carne ovina, especialmente em países em desenvolvimento, e aumento das importações pelos países da América do Norte, da Europa e do Oriente Médio. Apesar do crescimento da produção de

carne ovina nos últimos anos, o Brasil ainda importa, para abastecimento do mercado consumidor, cerca de 90% da carne ovina do Uruguai (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEGRAFIA E EESTATÍSTICA, 2013; VIANA, 2008).

Alguns desafios ainda são encontrados na exportação de carne ovina brasileira, como a necessidade de aumentar o rebanho efetivo, elevar a oferta de cordeiros para o abate e fortalecer a cadeia produtiva, por meio da organização de produtores (VIANA, 2008). Portanto, para garantir a participação do Brasil no mercado internacional desse 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. De fundamental importância dentre esses fatores é a elaboração de uma legislação sanitária específica para o controle do trânsito de ovinos provenientes de outros países ou de diferentes estados brasileiros (GUIMARÃES et al., 2009). Dessa forma, é possível prevenir a introdução de doenças anteriormente exóticas no Brasil e a disseminação de enfermidades entre diferentes regiões do país, possibilitando a redução de perdas genéticas e econômicas, bem como em restrições no comércio internacional de ovinos e de seus produtos (GUIMARÃES et al., 2009).

A LA é uma doença viral de notificação obrigatória, cujo impacto econômico na ovinocultura nacional ainda é pouco investigado (MACLACHLAN et al., 2009; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009). Já foram identificados 25 sorotipos do vírus em diversos países, afetando principalmente ruminantes domésticos e selvagens (MACLACHLAN et al., 2009).

A LA resulta não somente em perdas diretas e indiretas, mas também em restrições econômicas impostas por países importadores (OIE, 2009). A possível correlação da infecção pelo vírus da Língua Azul (VLA) com o desenvolvimento de outras doenças, como pneumonia, aborto e problemas

locomotores, ainda é pouco investigada no Brasil (ALFIERI et al., 2007). Um estudo realizado no estado de Minas Gerais, com a finalidade de avaliar as condições zoonosológicas da criação de ovinos no estado, revelou que o aborto e pneumonia estão dentre as principais alterações relatadas pelos proprietários nas regiões centro-oeste-sul do estado (GUIMARÃES et al., 2009)

No Brasil, dados soropidemiológicos têm demonstrado a presença do VLA em diversas regiões do país (COSTA et al., 2006; LAENDER, 2002; LOBATO, 1999;). Esse fato possivelmente está relacionado à permanência do vírus de forma imperceptível nos rebanhos brasileiros, levando à aparente ausência de casos clínicos de LA, nas diferentes regiões do país (ALFIERI et al., 2007). Em Minas Gerais, não há relatos da doença clínica em ovinos, sendo descrita somente nos estados do Paraná (CLAVIJO et al., 2002), Rio Grande do Sul (ANTONIASSI et al., 2010) e, recentemente, no Rio de Janeiro (BALARO et al., 2014).

Conduziu-se, este trabalho, com o objetivo de descrever a ocorrência da doença da LA em um rebanho ovino do Sul de Minas Gerais, associado ao sorotipo 4 do VLA, as características clinicopatológicas e a confirmação do diagnóstico por técnicas sorológicas e moleculares.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO DA DOENÇA DA LÍNGUA AZUL

### 2.1 Etiologia

A LA é causada por um vírus pertencente ao gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*, transmitida por artrópodes vetores (ALFIERI et al., 2007; MACLACHLAN et al., 2009; THOMPSON et al., 2011, VERWOERD; ERASMUS, 2004). Atualmente, são reconhecidos 26 sorotipos do VLA em todo mundo, agrupados de acordo com sua reatividade sorológica (MACLACHLAN et al., 2009; THOMPSON et al., 2011). Variações de patogenicidade e virulência, bem como tropismo tecidual e fetal, têm sido observadas entre os isolados de campo (ALFIERI et al., 2007).

Os vírions do VLA medem cerca de 65 a 75 nm, não possuem envelope lipídico e as proteínas que compõem a partícula viral estão dispostas em camadas concêntricas, formando uma simetria icosaédrica. Esses vírions são resistentes a solventes lipídicos e sensíveis a desinfetantes à base de iodóforos e fenóis. O genoma do VLA é formado por 10 segmentos de dsRNA que codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e três proteínas não estruturais (NS1 a NS3). A VP3 está associada com a integridade estrutural do núcleo viral, sendo altamente conservada entre os diferentes sorotipos do vírus. A VP7 é a proteína mais abundante encontrada no núcleo e contém os principais determinantes antigênicos específicos de grupo, associados com a estimulação da síntese de anticorpos. Acredita-se que a proteína VP1 seja a RNA polimerase viral responsável pela transcrição e replicação do genoma, durante a replicação viral nas células do hospedeiro (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

A VP2 é considerada a principal determinante do sorotipo, responsável pelo estímulo para a produção de anticorpos neutralizantes, bem como na

atividade de hemaglutinação e hemadsorção. As proteínas NS1, NS2 e NS3 são sintetizadas durante a replicação viral e, possivelmente, estejam envolvidas nesse processo e no mecanismo de transporte das partículas virais para membrana celular ou na prevenção de mitose em células infectadas (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

No Brasil, os sorotipos 12 e 4 foram isolados de ovinos com e sem manifestação clínica nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014; CLAVIJO et al., 2002).

## **2.2 Epidemiologia**

O VLA é capaz de infectar uma variedade de ruminantes domésticos e selvagens, incluindo ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos e cervídeos. A forma clínica da doença é mais comumente observada nos ovinos e cervídeos (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Entretanto, os bovinos são importantes epidemiologicamente, pois servem como reservatórios do vírus por períodos prolongados (ALFIERI et al., 2007; MACLACHLAN et al., 2009; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

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 28 a 41 dias em caprinos e cerca de 100 dias em bovinos. Essa fase caracteriza-se pela associação do vírus com células sanguíneas, principalmente monócitos, linfócitos e hemácias (ALFIERI et al., 2007).

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 (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). No Brasil, a primeira evidência de anticorpos contra o VLA foi relatada em bovinos e ovinos no estado de São Paulo (SILVA, 1978). A partir dessa data, vários inquéritos sorológicos em diferentes espécies de ruminantes vêm sendo realizados em diversas regiões do país, demonstrando que o vírus está amplamente disseminado no território brasileiro (COSTA et al., 2006; LOBATO, 1999; LAENDER, 2002; TOMICH et al., 2009).

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 muito baixos de soroprevalência.

As baixas taxas de soropositividade observadas nas regiões Nordeste e Sul podem estar associadas ao clima desfavorável do semiárido e de invernos mais rigorosos dessas duas regiões, respectivamente, o que dificultaria a multiplicação ou a manutenção do vetor (ALFIERI et al., 2007; COSTA et al., 2006; MELO et al., 2000). No sul do estado de Minas Gerais não existem relatos clínicos de doença. Recentemente, a LA foi relatada em um rebanho de ovinos nos estados do Rio de Janeiro (BALARO et al., 2014), anteriormente descrita apenas em ovinos no estado do Paraná (CLAVIJO et al., 2002) e no Rio Grande do Sul (ANTONIASSI et al., 2010). Levantamentos sorológicos da distribuição do VLA também não foram realizados no sul de Minas Gerais. Inquéritos sorológicos foram realizados principalmente nas regiões norte e nordeste do estado, com o intuito de verificar a distribuição e a prevalência do VLA, em diferentes espécies animais (LAENDER, 2002; LOBATO et al., 2001).



Em bovinos, observou-se positividade em mais de 59% dos animais analisados, sugerindo uma possível relação entre o elevado número de ovinos positivos, em Minas Gerais, com o fato da alta frequência de bovinos infectados. Estes, além de atuarem como reservatórios do vírus, podem desenvolver viremia de longa duração, aumentando a probabilidade de infecção de maior número de *Culicoides* (KONRAD et al., 2004). Em Minas Gerais, dois trabalhos com caprinos demonstraram soropositividade de mais de 40% dos animais testados (LAENDER, 2002; LOBATO et al., 2001) e em ovinos a soropositividade ficou em torno de 58% (LAENDER, 2002) e 61% (LOBATO et al., 2001) dos animais.

### **2.3 Patogenia**

A replicação viral inicialmente ocorre no local da picada do inseto vetor, principalmente em células endoteliais e em células do sistema linforreticular (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). A fase de viremia é caracterizada pela associação do vírus às células sanguíneas, seguida da sua disseminação para outros tecidos linfóides, de linfonodos, baço e medula óssea (ALFIERI et al., 2007; MACLACHLAN et al., 2009; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Nesses tecidos, o vírus se replica na microcirculação, especialmente da mucosa oral, levando a alterações patológicas características da doença. Diversos órgãos podem ser acometidos, incluindo pulmões, baço, coração, rim e bexiga (ALFIERI et al., 2007). Adicionalmente, o vírus, induz, de forma indireta, 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 vesículas citoplasmáticas, tumefação citoplasmática, picnose e cariorrexe (VERWOERD; ERASMUS, 2004). O endotélio apresenta-

se cuboide, podendo levar a oclusão e estase vascular. Eventualmente, podem ser encontradas alterações secundárias a lesão vascular, como hipóxia, edema e hemorragia (VERWOERD; ERASMUS, 2004).

#### **2.4 Sinais clínicos**

Os sinais clínicos da LA são manifestados de formas distintas entre as espécies de ruminantes, bem como entre diferentes raças de ovinos (VERWOERD; ERASMUS, 2004). Segundo Laender (2002), ovinos de todas as raças são suscetíveis à infecção pelo VLA, no entanto em graus variáveis, ocorrendo principalmente em raças exóticas, como a raça merino, introduzidas em regiões tropicais ou em rebanhos nativos localizados próximos a áreas endêmicas. Apesar da 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 (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

Nos ovinos, o período de incubação é variável entre cinco e dez dias, e o curso da doença pode variar de superagudo a crônico, com taxa de mortalidade variando entre dois e 30%. (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Na forma superaguda, os animais podem apresentar dispneia, como resultado do edema pulmonar. Dessa forma, os animais podem vir a óbito, geralmente como resultado de asfixia, após sete a nove dias de infecção (ANTONIASSI et al., 2010; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Nos casos crônicos pode ocorrer morte secundária a pneumonia causada por bactérias oportunistas, principalmente *Pasteurella* sp. (Verwoerd & Erasmus, 2004; Antoniassi et al., 2010).

Os sinais clínicos iniciais são caracterizados por aumento da temperatura para 41 a 42° e elevação da frequência respiratória (ALFIERI et al., 2007;

ANTONIASSI et al., 2010; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Adicionalmente, pode ser observada hiperemia em focinho, lábios e mucosa oral, que pode se estender para a pele (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Dentre as manifestações clínicas apresentadas, incluem-se edema generalizado na face, particularmente na região submandibular, descarga nasal serosa a mucopurulenta evoluindo para formação de crostas (ALFIERI et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2010; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Podem ocorrer edemaciação e protrusão da língua (ALFIERI et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2010; VERWOERD; ERASMUS, 2004;) e, eventualmente, a mesma pode apresentar-se cianótica, característica responsável pela denominação da doença (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Ulcerações orais incluindo língua podem propiciar a ocorrência de infecções secundárias, especialmente faringe e na porção superior do esôfago, causando vômitos e aspiração do conteúdo ruminal (ALFIERI et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2010).

Nas fases finais da infecção, pode ser observada inflamação da banda coronária do casco, geralmente resultando em laminite (ALFIERI et al., 2007). As lesões podais são mais pronunciadas nos bulbos dos cascos, particularmente nos dígitos laterais (VERWOERD; ERASMUS, 2004). Sinais de claudicação e prostração, decorrentes das lesões musculares e podais, podem ser observados nos animais acometidos. Ovinos infectados com o VLA também podem apresentar degeneração e necrose dos músculos esqueléticos cervicais e, em casos graves, evoluir para torcicolo irreversível e morte (VERWOERD; ERASMUS, 2004; Alfieri et al., 2007). A pele pode apresentar-se hiperêmica, com alterações mais exacerbadas quando os animais são expostos à luz solar (VERWOERD; ERASMUS, 2004). A infecção de ovelhas prenhes pode resultar em abortamento, em qualquer fase da gestação, natimortos, nascimento de

cordeiros fracos ou com alterações teratogênicas e infertilidade (ALFIERI et al., 2007; LOBATO, 1999; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

Em bovinos, a infecção pelo VLA é comum, embora sejam raras as manifestações clínicas da doença nessa espécie e, 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 (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). 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 mucosa nasal (ALFIERI et al., 2007).

## **2.5 Achados de necropsia e histopatologia**

As alterações macroscópicas encontradas na necropsia estão relacionadas com as lesões endoteliais, resultando em fragilidade vascular e, conseqüentemente, edema, congestão, hemorragias, inflamação e necrose (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Nos ovinos, áreas edemaciadas podem ser observadas na face e nas orelhas, e exsudato nas narinas. Comumente são observadas petéquias e lesões ulcerativas na cavidade oral e nas mucosas dos pré-estômagos, especialmente nas papilas e pilares rumenais e pregas do retículo (ALFIERI et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2010; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Hiperemia, edema e petéquias também podem ser observados na mucosa da cavidade nasal, bem como da faringe, da traquéia e de brônquios e bronquíolos. Em casos fatais da doença, os pulmões apresentam-se severamente hiperêmicos e edemaciados associados com espuma na traqueia e hidrotórax. Pneumonia aspirativa também é uma alteração ocasionalmente encontrada na necropsia (VERWOERD; ERASMUS, 2004),

atribuída a mionecrose esofágica, dilatação, regurgitação e acúmulo de alimento no lúmen do órgão (ANTONIASSI et al., 2010).

Do ponto de vista econômico, as alterações patológicas musculares são, provavelmente, as lesões mais importantes encontradas nos ovinos com LA (VERWOERD; ERASMUS, 2004). Macroscopicamente, são observadas petéquias, equimoses e edema no tecido conjuntivo intermuscular, particularmente nos músculos do pescoço da região torácica dorsal. Adicionalmente, podem ser visualizadas áreas multifocais de degeneração e necrose muscular (VERWOERD; ERASMUS, 2004). Áreas de hemorragia também são encontradas no coração, especialmente nos músculos papilares. Uma alteração macroscópica característica de infecção pelo VLA em ovinos é a hemorragia na base da artéria pulmonar, considerada uma lesão patognomônica da doença. (ALFIERI et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2010; MACLACHLAN et al., 2009; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

Ao exame microscópico são observadas infiltração de células inflamatórias mononucleares, degeneração e necrose de células epiteliais na mucosa (ALFIERI et al., 2007). As alterações encontradas nos músculos são compostas por necrose hialina e necrose e mineralização de fibras musculares individuais, associadas a edema e hemorragia intermuscular (ANTONIASSI et al., 2010; VERWOERD; ERASMUS, 2004). Infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como regeneração de fibras musculares podem ser observados, principalmente em casos crônicos da doença (VERWOERD; ERASMUS, 2004). Em casos de pneumonia aspirativa, as alterações encontradas incluem infiltrado inflamatório neutrofílico na luz de alvéolos, bronquíolos e brônquios, associado a material vegetal e estruturas compatíveis com bactérias na luz de brônquios (ANTONIASSI et al., 2010).

## 2.6 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 (ALFIERI et al., 2007). É importante incluir nos diagnósticos diferenciais ectima contagioso, febre aftosa, fotossensibilização e pneumonias (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004). 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 (OSBURN, 2007). O diagnóstico laboratorial é realizado por meio da coleta de sangue de forma amostral nos animais do rebanho, seguido da análise do soro e/ou sangue total, respectivamente, pela técnica de IDGA e RT-PCR (ALFIERI et al., 2007). Na análise bioquímica, o aumento nos níveis das enzimas CK e AST 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 diretos, baseados no isolamento e na identificação do vírus, ou indiretos, pela detecção de anticorpos específicos pela técnica de IDGA, considerada como padrão ouro de diagnóstico para LA. Em ruminantes, a resposta sorológica aparece de sete a 14 dias após infecção e geralmente persiste ao longo da vida do animal (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013). Para avaliação da ocorrência de anticorpos contra o VLA, podem ser empregadas técnicas de imunoensaio enzimático competitivo (cELISA), imunodifusão em gel de agar (IDGA), soroneutralização e fixação de complemento (FC) (LOBATO, 1999; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013). Esses testes identificam a exposição dos animais ao

vírus, e servem, na maioria das vezes, como teste complementar ao diagnóstico clínico (ALFIERI et al., 2007; OSBURN, 2007).

O teste mais importante para o diagnóstico da LA é o isolamento viral. Amostras de sangue e tecidos dos animais acometidos são utilizados em ovos embrionados, seguido de cultivo em células BHK. A identificação do VLA é realizada por imunofluorescência direta (IFD) e a tipificação pela técnica de soroneutralização (SN). Entretanto, o isolamento e o cultivo celular do vírus, a partir de amostras clínicas são bastante difíceis. Uma alternativa para o diagnóstico é a técnica da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) que detecta o ácido nucléico viral em amostras de sangue total, soro e tecidos (ALFIERI et al., 2007; OSBURN, 2007).

Os órgãos de eleição na RT-PCR são baço, medula óssea, coração e linfonodos mesentéricos (ALFIERI et al., 2007). O encéfalo e o baço, juntamente com o sangue e o soro, devem ser coletados de cordeiros ou bezerras com alterações congênitas. O material deve ser refrigerado e remetido rapidamente para o laboratório (ALFIERI et al., 2007).

### **2.6.1 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)**

O teste de IDGA é uma técnica simples amplamente utilizada para detecção de anticorpos em diferentes espécies suscetíveis e para qualificação de animais para exportação (LOBATO, 1999). O teste é considerado como importante ferramenta para a vigilância epidemiológica da doença e para a emissão de certificados de trânsito para rebanhos destinados à exportação (ALFIERI et al., 2007; LOBATO, 1999; OSBURN, 2007).

A IDGA detecta anticorpos antiVP7, sendo considerado o principal método utilizado para a identificação da soroprevalência para o VLA em diferentes espécies de ruminantes. No entanto, reações cruzadas podem ocorrer

com outros Orbivírus, como o vírus da doença hemorrágica epizootica dos cervídeos (EHD) e vírus da doença equina africana (COSTA et al., 2006).

A metodologia é realizada conforme a recomendação disponível pelos kits de diagnóstico comerciais. A IDGA é utilizada para a pesquisa de anticorpos precipitantes contra o VLA em amostras de soros. Para análise, é utilizada solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% e agarose na concentração final de 0,9% em água destilada deionizada, posteriormente depositada sobre lâminas. O antígeno é colocado no centro e o soro controle positivo em outros dois poços na quantidade de 30 µL em cada poço; nos poços restantes são colocadas as amostras a serem testadas. As lâminas permanecem em câmara úmida com azida sódica a 1% por 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas são observadas em microscópio de luz indireta e campo escuro (SOUZA et al., 2010).

Segundo Costa et al. (2006), o teste de IDGA se mostrou eficiente para a detecção de anticorpos contra VLA em rebanhos ovinos do estado da Bahia. Foram coletadas amostras de sangue dos animais com suspeita clínica de LA, por punção da veia jugular, utilizando-se tubos tipo *vacutainer* sem anticoagulante. Após a formação de coágulo, os tubos foram centrifugados a 1.500 g por 10 minutos para a obtenção dos soros, que foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf e estocados a -20° C até a realização dos testes sorológicos. Para a realização do teste de IDGA, foi utilizada suspensão de agarose a 0,9% em solução de 0,85% de NaCl, com 20µL de soro padrão, soro teste e antígeno, seguida da leitura após 24 e 48 horas de incubação, conforme recomendado pelo kit comercial Veterinary Medical Research and Development (VMRD).



### **2.6.2 Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia pela de Polimerase (RT-PCR)**

Para a detecção do VLA em amostras clínicas, pode ser utilizado o isolamento do vírus em cultivo celular. No entanto, a técnica de RT-PCR, tem sido utilizada, pois possibilita a detecção de partículas virais não infectantes no exame *antemortem* (ALFIERI et al., 2007). A RT-PCR pode ser empregada com intuito de detectar o ácido nucléico viral em amostras de sangue e tecidos (ALFIERI et al., 2007; VERWOERD; ERASMUS, 2004).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma reação enzimática de polimerização de sequências de DNA “*in vitro*”. É necessária uma molécula de DNA como molde para ocorrer a reação. Basicamente a reação é realizada em três etapas. A primeira etapa consiste em desnaturar a fita dupla do DNA, através do aquecimento 90-96°C, levando ao rompimento de pontes de hidrogênio. A etapa seguinte é denominada hibridização ou anelamento e caracteriza-se pela ligação da sequência-alvo a ser amplificada com pequenas moléculas com segmentos específicos do DNA e oligonucleotídeos, conhecidos como “primers”, que são quimicamente sintetizados e de cadeia simples. Finalmente, ocorre a síntese de DNA por enzimas polimerases que incorporam nucleotídeos complementares, levando à formação de novas cópias idênticas às originais (LIMA, 2013; POWLEDGE, 2004).

No entanto, quando a reação possui como molde inicial uma molécula de RNA, é necessário realizar, inicialmente, a transcrição reversa (RT-PCR), a qual transforma o RNA em um DNA complementar (cDNA). Nesse processo, é utilizada a enzima transcriptase reversa, que é aquecida a aproximadamente 45°C, por 30 a 60 minutos. Após a produção do cDNA, a PCR ocorre normalmente (LIMA, 2013; VALASEK; REPA, 2005). A detecção do DNA amplificado pode ser realizada pela eletroforese em gel de agarose e visualizado

pelo brometo de etídeo ou gel Red®, que fluorescem quando expostos a luz ultravioleta, em razão do acúmulo entre as partes de DNA (LIMA, 2013; POWLEDGE, 2004).

A RT-PCR é amplamente utilizada no diagnóstico de LA, pois permite a amplificação de fragmentos virais específicos de segmentos contidos no genoma do VLA. Os amplicons obtidos no RT-PCR são sequenciados e comparados com sequências disponíveis em bancos de dados, como GeneBank (ANTONIASSI et al., 2010). A RT-PCR multiplex foi utilizada por Aradaib et al. (2003) para detecção e diferenciação simultânea entre VLA e entre EHD. Os resultados encontrados demonstraram que essa técnica é um método rápido, sensível e específico para diferenciação entre as espécies do gênero *Orbivirus*. Oligonucleotídeos derivados de genes altamente conservados, tais como VP3, VP6, VP7, NS1 e NS3 podem ser usados para a triagem de animais positivos, visto que reagem com todos os membros do sorogrupo do VLA (LIMA, 2013; WILSON et al., 2000). A caracterização molecular do vírus da LA está baseada na sequência do segmento 2 (Seg-2) do genoma viral, que codifica a proteína VP2.

A VP2 é considerada a maior determinante do sorotipo viral, pois é a proteína do vírus mais variável e que possui a maior parte dos epítomos que interagem com os anticorpos neutralizantes (LIMA, 2013; MAAN et al., 2007). A tipificação de sorotipos virais também tem sido feita por meio de sequenciamento. Maan et al. (2007) realizaram um sequenciamento de cópias de cDNA do Seg-2 de cepas de 24 dos 26 sorotipos do VLA e concluíram que há uma correlação entre a variação na sequência do Seg-2/VP2 com o sorotipo viral.

Fragmentos de pulmão, baço e linfonodo podem ser coletados e macerados com solução de tampão fosfato-salino (PBS). O RNA do macerado é extraído com trizol para a técnica de RT-PCR para o VLA.

A associação entre técnicas sorológicas e moleculares tem demonstrado resultados favoráveis na determinação de viremias (VERWOERD; ERASMUS, 2004).

## **2.7 Controle e profilaxia**

Em áreas livres, as medidas preventivas para a entrada do VLA são o controle do trânsito de animais e fiscalização rigorosa na importação de animais suscetíveis (ALFIERI et al., 2007). Segundo as recomendações da OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009), é importante realizar quarentena, preferencialmente acompanhada de dois a três testes sorológicos, antes dos animais serem introduzidos no rebanho. A identificação dos sorotipos existentes no país exportador e a determinação de vetores competentes para esses sorotipos no país importador são medidas fundamentais para impedir a entrada do vírus em áreas livres de LA (KONRAD et al., 2004). Na América do Sul, a prevenção da doença ocorre, principalmente, por notificação obrigatória e controle de fronteiras, especialmente na Argentina e no Brasil, por vigilância e monitoramento de animais (ALFIERI et al., 2007; LIMA, 2013).

No Brasil, para a importação de caprinos e ovinos, é necessário o isolamento dos animais, durante um período de trinta dias antes do embarque, em instalações aprovadas e supervisionadas. Durante a quarentena, os animais são submetidos a exames de diagnóstico para febre aftosa, brucelose, língua azul e lentivirose de pequenos ruminantes, realizados em laboratório oficial ou credenciado pelos serviços veterinários oficiais. Para o diagnóstico da LA, são realizados testes sorológicos de IDGA ou ELISA (BRASIL, 2003).

Em locais onde a infecção foi detectada devem ser adotados o diagnóstico rápido, a desinfecção rigorosa, o controle de vetores e notificação

obrigatória. No entanto, nos casos de animais infectados sem manifestações clínicas da doença o vírus pode se disseminar de forma inaparente no rebanho, principalmente na espécie bovina (ALFIERI et al., 2007). Em áreas endêmicas, a possibilidade de erradicação da LA é mínima, sendo necessárias medidas que visem a reduzir os prejuízos causados pela doença clínica. Nesses casos, o controle da doença é baseado na interrupção do ciclo de transmissão, por meio do controle de vetores, reduzindo o número de hospedeiros suscetíveis (ALFIERI et al., 2007; LIMA, 2013).

No Brasil, não há vacinas disponíveis, pois a real distribuição e o impacto econômico da doença, bem como os sorotipos prevalentes no país, ainda são pouco conhecidos nos rebanhos ovinos (ALFIERI et al., 2007). No entanto, a vacinação é adotada rotineiramente em países como África do Sul, onde a doença tem causado prejuízo para criadores de ovinos. As vacinas comerciais disponíveis são atenuadas, inativadas ou recombinantes e geralmente polivalentes, contendo o sorotipo prevalente em cada área suscetível (ALFIERI et al., 2007; LIMA, 2013). Segundo a OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009), estão sendo utilizadas preferencialmente vacinas inativadas, pois o vírus inativado elimina os riscos de transmissão vetorial, reversão da virulência e o aparecimento de anomalias fetais.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho é o primeiro estudo da ocorrência e da caracterização da doença clínica de Língua Azul em ovinos no estado de Minas Gerais. O isolamento e a tipificação viral permitiram a identificação do sorotipo 4 do Vírus da Língua Azul, sendo o primeiro relato de surto em ovinos, no estado, com a doença clínica, nos quais foi isolado esse sorotipo.

O estudo do quadro clinicopatológico e a realização de necropsias e histopatologia são de extrema importância para o diagnóstico da enfermidade, visto que a maioria dos casos se apresenta de forma subclínica ou associada a outras doenças concomitantes. Os resultados salientam a necessidade de aperfeiçoamento da vigilância da infecção por VLA no Brasil, pois a sua distribuição e sua epidemiologia são, ainda, pouco conhecidas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V. L. V. **Prevalência de bovídeos reagentes à prova de imunodifusão para Língua Azul na Região Norte do Brasil**. 1982.45 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.
- ALFIERI, A. A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM. 2007. p. 773-807.
- 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**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 12, 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**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 77-87, Mar. 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**, Bimonthly, v. 26, n. 4, p. 567-570, June 2014.
- BORGES, I.; SILVA, A. G. M.; VIANA, R. O. Agronegócio da ovinocultura. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 22., 2004, Brasília. **Anais...** Brasília: Faculdades Integradas, 2004. p. 1-22.
- BRASIL. **Instrução Normativa n. 17, de 10 de abril de 2003**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 11 fev. 2015.
- CLAVIJO, A. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **The Veterinary Record**, England, v. 151, n. 10, p. 301-302, Sept. 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**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 273-275, abr. 2006.

DORNELES, E. M. S. et al. Prevalence of bluetongue vírus antibodies in sheep from Distrito Federal, Brazil. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1521-1524, jul./ago. 2012.

GUIMARÃES, A. S. et al. Características zoossanitárias da ovinocultura em Minas Gerais. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Belo Horizonte, v. 102, p. 34-39, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção pecuária municipal**. [S.l.]: IBGE, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 23 jan. 2015.

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**, Uruguaiana, v. 10, n. 1, p. 42-51, 2004.

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.** 2002. 92 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LIMA, M. S. **Caracterização do vírus da língua azul em ovinos, caprinos e cervídeos no Brasil.** 2013. 120 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Instituto Biológico, São Paulo.

LOBATO, Z. I. P. et al. Língua Azul em ovinos e caprinos na Região Mineira da SUDENE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4., 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: BICCA, 2001. p. 165.

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

MAAN, S. et al. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 2, p. 621-630, Feb. 2007.

MACLACHLAN, N. J. et al. The pathology and pathogenesis of bluetongue. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 141, n. 1, p. 1-16, July 2009.

MELO, C. B. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 29-20, Feb. 2000.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Estatísticas FAO**. Washington: FAO, 2007. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 04 mar. 2013.

OSBURN, B. I. Bluetongue. In: AITKEN, I. D. **Disease of sheep**. 4th. ed. Iowa: Blackwell, 2007. p. 456-459.

POWLEDGE, T. M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**, Bethesda, v. 28, n. 2, p. 44-50, 2004.

SILVA, F. J. F. **Relatório sobre estudos de ocorrência de Língua Azul em São Paulo**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1978. 92 p.

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

SOUZA, T. S. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 419-427, jul./set. 2010.

THOMPSON, G. M. et al. A review of bluetongue disease and its implications for Ireland. **Tearman**, Washington, n. 8, p. 45-58, 2011.

TOMICH, 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**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1222-1226, out. 2009.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, Bethesda, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VERWOERD, D. W.; ERASMUS, B. J. Bluetongue. In: COETZER, J. A. W. **Infectious disease of livestock**: volume 2. 2<sup>nd</sup>. ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004. Cap. 102, p. 1201-1220.



VIANA, J. G. A. Panorama Geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, v. 4, n. 12, p. 1-9, mar. 2008.

WILSON, D. C. et al. Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. **Virus Research**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 141-151, Apr. 2000.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Bluetongue**: aetiology epidemiology diagnosis prevention and control references. New York: OIE, 2009. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 4 mar. 2013.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO****ARTIGO 1 Diagnóstico patológico e laboratorial da infecção pelo vírus da língua azul em ovinos**

Este artigo foi redigido de acordo com as normas da revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* para submissão.

[*Pathological and laboratory diagnosis of bluetongue virus infection in sheep*]

P. A. Lima<sup>1</sup>, K. Y. R. Nakagaki<sup>1</sup>, K.U. Utiumi<sup>1</sup>, D. A. Biihrer<sup>1</sup>, A. S. Albuquerque<sup>1</sup>, Z. I. P. Lobato<sup>2</sup>, D. Driemeier<sup>4</sup>, M. S. Varaschin<sup>1</sup> & D. L. Raymundo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Patologia Veterinária - Universidade Federal de Lavras, (UFLA), Campus Universitário, Caixa Postal 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: djeison.raymundo@dmv.ufla.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG), Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

<sup>4</sup>Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## RESUMO

A Língua Azul (LA) é uma doença viral transmitida por vetores do gênero *Culicoides*. No Brasil a identificação de anticorpos contra o vírus da Língua Azul tem sido realizada há mais de trinta anos, porém descrições de diagnóstico clinicopatológico da doença são escassos. Este estudo descreve alterações clinicopatológicas da LA em Minas Gerais. De um rebanho de 80 ovinos machos, 28 morreram. Apresentaram sinais clínicos de pneumonia, anemia e hipoproteinemia. Na necropsia, as principais alterações observadas foram consolidação pulmonar cranioventral e hemorragia na base da artéria pulmonar. Na histopatologia havia lesões pulmonares caracterizadas por broncopneumonia purulenta, além de necrose hialina e flocular em fibras musculares esqueléticas e cardíacas, associada a infiltrado inflamatório mononuclear discreto entre fibras e ao redor de vasos sanguíneos. O diagnóstico de LA foi confirmado pelo isolamento e pela tipificação do vírus da LA sorotipo 4 em amostras de sangue e tecidos de ovinos do rebanho por meio da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e pela detecção de anticorpos contra o vírus da LA no exame sorológico de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) em amostras de soro de ovinos remanescentes no rebanho. O objetivo deste trabalho é descrever o primeiro caso de LA clínica em um rebanho ovino da região sul de Minas Gerais. Os achados de necropsia e histopatologia associados ao isolamento e tipificação viral permitiram a confirmação de LA em ovinos. A ocorrência de animais soropositivos para o vírus, demonstram que a doença pode estar ocorrendo de forma imperceptível nos rebanhos ovinos da região.

Palavras-chave: RT-PCR, doenças virais, IDGA,

### ABSTRACT

*Bluetongue (BT) is a viral disease transmitted by vectors of the genus Culicoides. In Brazil, the identification of antibodies against the virus has been held for over thirty years, however clinicopathological diagnosis of the disease are scarce. This study describes the clinicopathological changes in sheep with BT in Minas Gerais, Brazil . In a flock of 80 male sheep 28 died. They showed clinical signs of pneumonia, anemia, and hypoproteinemia. At necropsy, the main changes observed were cranioventral lung consolidation and, hemorrhage at the base of the pulmonary artery. The histological changes consisted of bacterial bronchopneumonia and hyaline and flocculate necrosis in skeletal and cardiac muscle fibers were also observed,, associated with moderate mononuclear inflammatory infiltrate between fibers and around blood vessels. The diagnosis of BT was confirmed by the identification of nucleic acids of the virus in blood samples and from tissues of animals from the herd by RT-PCR and by the detection of antibodies against Bluetongue virus with the agar gel immunodiffusion (AGID) test using serum samples from the remaining herd animals. The objective of this study is to describe the first case of clinical LA in a sheep flock of southern Minas Gerais. The necropsy and histopathology associated with viral isolation and typing allowed the confirmation of LA in sheep. The occurrence of seropositive animals to the virus, showing that the disease may be occurring imperceptibly in sheep herds in the region.*

**Keywords:** *RT-PCR, viral diseases, AGID*

## INTRODUÇÃO

A Língua azul (LA) é uma doença viral, não contagiosa, transmitida por artrópodes hematófagos, principalmente do gênero *Culicoides*. O Vírus da Língua Azul (VLA) pertence ao gênero Orbivírus, da família Reoviridae e, até hoje, são reconhecidos 26 sorotipos do vírus em todo o mundo. Provavelmente todas as espécies de ruminantes domésticos e selvagens são suscetíveis à infecção pelo VLA, porém, na maioria dos casos, a infecção apresenta-se subclínica (Maclachlan et al., 2009). Os animais domésticos mais suscetíveis ao VLA são os ovinos, mas há variações consideráveis na expressão da doença, dependendo de raça, idade, estado imunitário, circunstâncias ambientais e o sorotipo do vírus. As lesões se caracterizam principalmente por edema pulmonar, hemorragias e úlceras nas mucosas do trato digestório, necrose de músculos liso, estriado esquelético e cardíaco, hemorragia na camada subintimal da artéria pulmonar e edema difuso (Brown et al., 2007; Maclachlan et al., 2009). A morbidade pode chegar a 100% em ovinos, com mortalidade entre 30 e 70% (OIE, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a LA é uma doença de notificação obrigatória, que pode causar consequências sócio-econômicas e sanitárias graves, tanto por perdas diretas nos rebanhos devidas a abortos, queda no desempenho produtivo e reprodutivo, perda de condição corporal, como também por repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (Konrad et al., 2003; Costa et al., 2006). A distribuição global do VLA coincide com a distribuição dos vetores competentes e de condições climáticas apropriadas. Áreas tropicais e subtropicais são consideradas endêmicas em quase todos os continentes (Maclachlan et al., 2009).

No Brasil, evidências sorológicas demonstraram a presença do vírus pela primeira vez em 1978, quando foi isolado o sorotipo 4 de bovinos que estavam

em quarentena, exportados do Brasil para os Estados Unidos (Grocock e Campbell, 1982). O VLA se encontra amplamente distribuído por todo território nacional, sendo que a maior prevalência de animais soropositivos encontra-se nas Regiões Norte e Sudeste; e a menor na Região Sul (Grocock e Campbell, 1982; Laender, 2002). Apesar da ocorrência do vírus no Brasil, doença clínica só foi relatada duas vezes. O primeiro relato ocorreu no estado do Paraná em 2001, no qual foram observados sinais clínicos compatíveis com a doença em vinte e um carneiros com confirmação do diagnóstico pelo isolamento do sorotipo 12 de VLA pela técnica de RT-PCR (Clavijo et al., 2002). No Rio Grande do Sul foram descritos, em 2009, dois surtos da doença em 15 ovinos que apresentavam achados clinicopatológicos compatíveis com LA, sendo o diagnóstico realizado por histopatologia e confirmado pela detecção do sorotipo 12 por RT-PCR (Antoniassi et al., 2010).

Este trabalho relata a ocorrência da Língua azul, caracterizando a doença clínica, achados de necropsia e histopatológicos, e a comprovação sorológica e molecular da ocorrência do vírus em ovinos no estado de Minas Gerais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

De um rebanho de 80 ovinos, 28 foram encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA) para necropsia. O histórico clínico dos animais foi obtido com o responsável pelo rebanho.

Amostras de tecidos e órgãos foram coletadas e fixadas em solução de formalina 10% tamponada e processadas rotineiramente para histopatologia. Fragmentos de baço e linfonodo de seis animais foram congelados e encaminhados para a realização da técnica de Transcriptase Reversa seguida da

Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR). Amostras de soro e sangue total dos animais remanescentes do rebanho foram coletadas e enviadas para a identificação de anticorpos contra o VLA, pelo teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e identificação de ácidos nucléicos do vírus por meio da RT-PCR. Todas as amostras coletadas para sorologia e RT-PCR foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Amostras dos tecidos positivos foram utilizadas para infectar culturas de Células KC para isolamento do vírus e análise de tipificação.

Amostras de sangue de ovinos do rebanho foram coletadas em EDTA, refrigeradas e encaminhadas para hemograma.

## **RESULTADOS**

Em dezembro de 2011 oitenta ovinos machos, Santa Inês, com aproximadamente 5 meses de idade foram adquiridos por uma instituição para a realização de experimento de ganho de peso. Após a chegada, alguns ovinos começaram a apresentar espirros, tosse e secreção nasal mucopurulenta, e outros com sinais de anemia e hipoproteinemia. Foi realizada medicação antimicrobiana e, como houve melhora clínica significativa dos problemas respiratórios, o tratamento foi interrompido. Ao longo dos dois meses seguintes diversos animais voltaram a adoecer, com manifestação de tosse, espirros, prostração, febre, corrimento nasal mucopurulento, anemia e edema submandibular, e 28 ovinos morreram.

Na necropsia, seis ovinos apresentaram lesões crostosas nas orelhas e mucosas pálidas. As lesões mais frequentes foram as pulmonares; em 18/28 ovinos havia consolidação pulmonar cranioventral (Figura 1A) e, em um deles, havia conteúdo alimentar na luz de traqueia e brônquios. No coração de três ovinos foi observada área de hemorragia na base da artéria pulmonar (Figura

1B). Havia quantidade moderada de exemplares de *Haemonchussp.* no abomaso de 12 ovinos. Um animal apresentou lesões ulcerativas na mucosa de palato duro, rúmen e retículo (Figura 1C e 1D).

No exame histopatológico as principais lesões foram observadas no sistema respiratório; com broncopneumonia bacteriana em 13 ovinos, caracterizada por hiperemia edema, necrose multifocal, infiltrado inflamatório neutrofílico associado a estruturas granulares basofílicas compatíveis com colônias bacterianas (Figura 2A). Em quatro animais foram observadas lesões no tecido muscular do esôfago, que correspondiam a necrose hialina e flocular difusa moderada, associada a infiltrado inflamatório mononuclear discreto entre fibras musculares e ao redor de vasos sanguíneos (Figura 2B). Alterações semelhantes também foram encontradas em intensidade variada no miocárdio de três ovinos e nos músculos esqueléticos de 10. Na musculatura da língua de dois animais foi observada necrose focalmente extensa nas camadas epitelial e muscular profunda, associada a hemorragia, colônias bacterianas, e havia áreas de calcificação e infiltrado inflamatório mononuclear entre as fibras musculares e ao redor de vasos sanguíneos. No rúmen e no retículo de um ovino foram observadas áreas de necrose de papilas associadas a estruturas bacterianas, vasculite multifocal na submucosa e trombos em vasos da serosa. Havia ainda hepatite mononuclear em quatro animais, hiperqueratose acentuada na pele da orelha de seis ovinos, associada a infiltrado inflamatório neutrofílico na epiderme; degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais epidérmicas associada a corpúsculos basofílicosintracitoplasmáticos, associados ao ectima contagioso, em dois ovinos.

As amostras de baço e linfonodo de cinco ovinos necropsiados foram positivas para o VLA na RT-PCR. O teste comprovou a presença de ácido nucléico do vírus em cinco das 21 amostras de sangue analisadas. No teste de IDGA, nove dos 14 soros foram positivos para o VLA. Das 13 amostras



sanguíneas analisadas, todas apresentaram moderada a acentuada hipocromia e anisocitosemicrocítica, leucocitose moderada a acentuada e, em nove amostras, havia também eosinofilia moderada. A tipificação identificou o sorotipo BTV-4 nas amostras analisadas.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de LA foi realizado pelos achados de necropsia e histopatológicos, com confirmação pela detecção de anticorpos no teste de IDGA e presença do VLA na RT-PCR.

As principais lesões da LA resultam da invasão das células endoteliais pelo vírus, induzindo hemorragia, necrose e infarto nos tecidos. A disfunção endotelial pode ser agravada pela liberação de componentes vasoativos e inflamatórios, levando a um aumento da permeabilidade vascular (Verwoerd e Erasmus, 2004; Alfieri et al., 2007; Maclachlan et al., 2009). A hemorragia na base da artéria pulmonar, considerada lesão característica da doença (Brown et al., 2007), foi observada em três ovinos necropsiados. Degeneração e necrose de músculo liso, esquelético e cardíaco são também lesões características da doença (Maclachlan et al., 2009) e ocorreram em nove ovinos necropsiados. A presença de fibra alimentar na traqueia e nos brônquios de um animal provavelmente é consequência da disfagia por necrose muscular na parede esofágica, alteração ocasionalmente associada com infecções pelo VLA (Antoniassi et al., 2010), corroborando com o diagnóstico. As alterações de necrose e hemorragia em palato duro e proventrículos observadas em um animal também são associadas à injúria endotelial (Verwoerd e Erasmus, 2004; Alfieri et al., 2007; Antoniassi et al., 2010). As lesões pulmonares observadas no presente estudo são fortemente sugestivas de pneumonia causada por bactérias oportunistas, principalmente *Mannheimia haemolytica*, bactéria mais comumente associada em casos de

pneumonia em ovinos com LA (Verwoerd e Erasmus, 2004; Antoniassi et al., 2010).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o vírus estava presente no rebanho ovino da região do Sul de Minas Gerais, causando doença clínica em alguns animais. Apenas um dos ovinos apresentou lesões graves de LA, com hemorragia na base da artéria pulmonar, necrose muscular e na mucosa do palato duro, do rúmen e do retículo. Os demais animais do rebanho apresentaram sinais clínicos e lesões discretas, algumas vezes observadas somente no exame histológico, sendo as mortes relacionadas principalmente aos fatores secundários. As lesões de necropsia encontradas nos casos clínicos de LA já foram descritos por outros autores (Antoniassi et al., 2010; Balara et al., 2014).

O teste sorológico utilizado para o diagnóstico do rebanho foi a IDGA, considerado como padrão ouro para detecção de anticorpos anti-VLA (Lager 2004; OIE, 2011). O resultado positivo em nove das 14 amostras de soro enviadas confirma que os animais foram previamente infectados e que o vírus circula no rebanho (Maclachlan et al., 2009). Na RT-PCR, outra técnica utilizada no diagnóstico, foram detectados ácidos nucleicos do VLA em amostras de sangue total, linfonodo e baço de 21 ovinos remanescentes no rebanho e em cinco animais necropsiados. Esse método detecta uma região altamente conservada do VLA e tem demonstrado ser mais rápido, simples e sensível, em comparação com ensaios padrão de detecção do vírus (Billiniset al., 2001). Baseado nos resultados do hemograma, o aumento de leucócitos observado nas amostras sanguíneas dos ovinos possivelmente está relacionado ao desenvolvimento de pneumonia bacteriana secundária, apresentada pelos ovinos do rebanho.

Em Minas Gerais, levantamento soropidemiológico para VLA foi realizado na região nordeste do Estado, sendo demonstrada ocorrência do vírus da LA em 58,6% dos ovinos (Laender, 2002). No entanto, este é o primeiro relato de

doença clínica no Estado e o terceiro no Brasil. Alterações clinicopatológicas semelhantes às descritas neste estudo foram relatadas em dois surtos de VLA em ovinos do estado do Rio Grande do Sul (Antoniassiet al., 2010), em que o diagnóstico também foi confirmando pela técnica de RT-PCR.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho é o primeiro estudo da ocorrência e da caracterização da doença clínica de Língua Azul em ovinos no estado de Minas Gerais. O isolamento e a tipificação viral permitiram a identificação do sorotipo 4 do Vírus da Língua Azul, sendo o primeiro relato de surto em ovinos no estado com a doença clínica nos quais foi isolado este sorotipo.

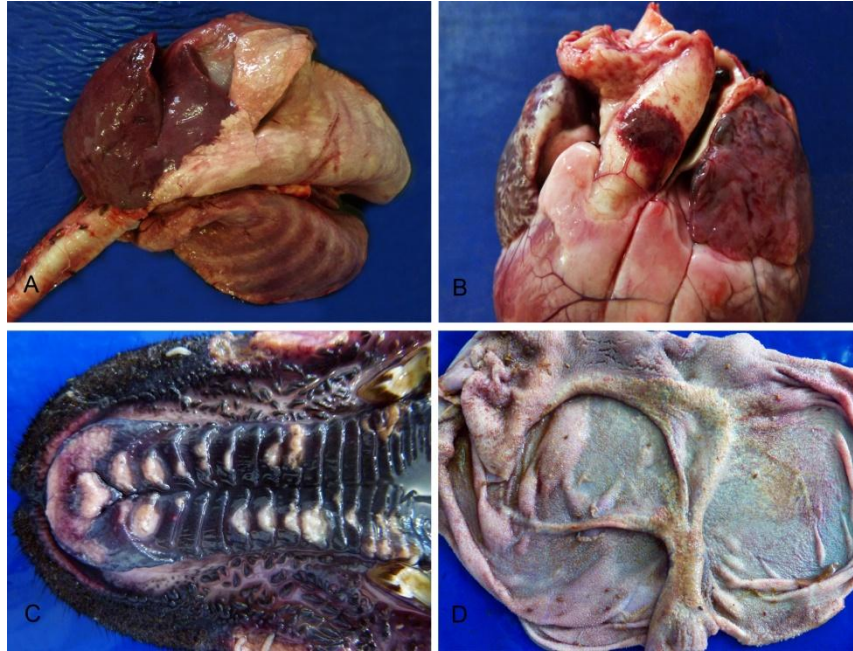
O estudo do quadro clinicopatológico e a realização de necropsias e histopatologia são de extrema importância para o diagnóstico da enfermidade, visto que a maioria dos casos se apresenta de forma subclínica ou associada a outras doenças concomitantes. Os resultados salientam a necessidade de aperfeiçoamento da vigilância da infecção por VLA no Brasil, pois a sua distribuição e sua epidemiologia são ainda pouco conhecidas.

**Agradecimentos.-** Ao Dr. Fladimir Wouters, do Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, pelo auxílio nas correções e na composição das imagens utilizadas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro.

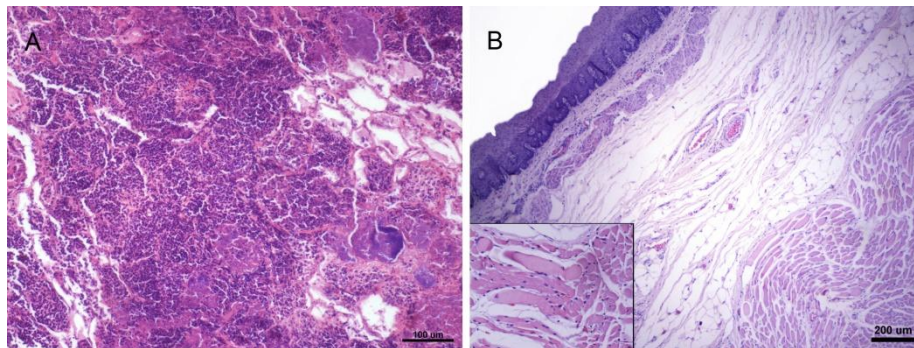
## REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: Flores E.F. (Ed). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM. p.773-807, 2007.
- ANTONIASSI, N.A.B.; PAVARINI, S.P.; RIBEIRO, L.A.O. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, p.1010-1016, 2010.
- 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.
- BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; SPYROU, V. et al. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *J. Virol. Methods.*, v.98, p.77-89, 2001.
- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. 2007. Alimentary system, p.1-297. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J. et al. Isolation of Bluetongue Virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet. Rec.*, v.151, p.301-302, 2002.
- COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMANN, G.P. et al. 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.*, v.58, p.273-275, 2006.
- GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.* v.46, p.160-164, 1982.
- KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. *Revista FZVA.*, v.10, p.117-125, 2003.
- LAENDER, J.O. *Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise de evidência e sorológica e identificação de Culicoides sp.* 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- LAGER, I.A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet. Ital.*, v.40, p.89-93, 2004.
- MACLACHLAN, N.J.; DREW, C.P.; DARPEL, K.E.; WORWA, G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.*, v.141, p.1-16, 2009.
- VERWOERD, D.W.; ERASMUS, B.J. Bluetongue. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN R.C. *Infectious Disease of Livestock*. 2nd ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004. v.2, cap.102. p.1201-1220.

**Figuras**

**Fig. 1.** Ovinos naturalmente infectados pelo vírus da Língua Azul. **(A)** Pulmões com consolidação cranioventral. **(B)** Área de hemorragia na base da artéria pulmonar. **(C)** Lesões ulcerativas na mucosa do palato duro. **(D)** Rúmen com áreas de ulceração e hemorragia.



**Fig. 2.** Ovino. Língua Azul. **(A)** Pulmão. Necrose multifocal associada a infiltrado inflamatório neutrofílico e colônias bacterianas intralésionais. HE. Obj. 20 **(B)** Músculo estriado do esôfago com necrose hialina e flocular difusa de miofibras associada a infiltrado mononuclear discreto. HE. Obj. 20.