

LUCAS DE SOUZA QUEVEDO

**ESTUDO RETROSPECTIVO E OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM
OVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.

Orientador: Dr. Aldo Gava

LAGES, SC

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Quevedo, Lucas

Estudo retrospectivo e ocorrência do vírus da língua azul em
ovinos no estado de Santa Catarina / Lucas Quevedo. -- 2020.
59 p.

Orientador: Aldo Gava

Coorientador: Ubirajara Maciel da Costa

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

1. Bluetongue. 2. Dilatação esofágica. 3. Patologia. 4.
Emagrecimento progressivo. I. Gava, Aldo. II. Maciel da Costa,
Ubirajara. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal. IV. Título.

LUCAS DE SOUZA QUEVEDO

**ESTUDO RETROSPECTIVO E OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM
OVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientador:



Prof. Dr. Aldo Gava

Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC

Membro:



Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC

Membro:



Dr. Ana Lucia Schile

Universidade Federal de Pelotas/UFPeI

Lages, 17 de fevereiro de 2020

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Rosane Quevedo e Luis Quevedo por serem essenciais em minha vida, ao meu irmão Pedro Quevedo, meu avô José Carlos e minha avó Maria Helena Souza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador Prof. Aldo Gava, pela orientação, seu grande desprendimento em ajudar-nos e amizade.

Aos demais professores André Thaler, Ubirajara da Costa e Eduardo Flores pelos ensinamentos e disponibilidade em nos auxiliar durante o projeto.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC, principalmente a Raissa Moraes e o Gustavo Huguen.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

QUEVEDO L.S. **Estudo retrospectivo e ocorrência do vírus da língua azul em ovinos no estado de Santa Catarina.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de Concentração: Sanidade e Patologia Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

O vírus da língua azul é um *Orbivirus* pertencente à família Reoviridae, é responsável por causar doença não-contagiosa em ruminantes e tem como transmissor mosquitos do gênero *Culicoides*. Neste estudo são descritos os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos de dez surtos de Língua Azul em ovinos, diagnosticados no período de dez anos no estado de Santa Catarina e avaliar por meio de testes sorológicos de imunodifusão em ágar gel a ocorrência da infecção do Vírus da Língua Azul no estado de Santa Catarina. Para o estudo o estado foi dividido em três regiões, Oeste (região 1), Litoral, Vale do Itajaí, Planalto Norte (região 2) e Serrana/ Planalto Sul (região 3). As quais foram selecionadas e classificadas conforme suas características climáticas. A enfermidade foi diagnosticada nos municípios de Chapecó, São José do Cedro, Planalto Alegre, Pouso Redondo, Orleans, Riqueza, São Ludgero, Bom Retiro, Nova Veneza e Campo Alegre entre os anos de 2009 a 2019. Os ovinos inicialmente desenvolveram ulcerações da narina, lábios e mucosa oral com formação de crostas, dificuldade locomotora, diarreia enegrecida, tosse, regurgitamento e vômito seguido de morte. O curso da doença variou de um a oito dias, e os que não morreram até o oitavo dia mostraram recuperação aparente. De acordo com informações dos proprietários onde a doença aguda ocorreu, após 2-3 meses, alguns ovinos mostraram regurgitação de alimento e emagrecimento progressivo. Macroscopicamente observou-se multitiplas úlceras de um a cinco milímetros no palato, edema subcutâneo na face, pescoço e lateral do tórax, hidrotórax e hidropericardio, congestão e edema pulmonar, hemorragias petequiais na serosa do esôfago próximo ao hiato esofágico e hemorragia focal no terço inicial da artéria pulmonar. Na microscopia as principais lesões observadas no esôfago, nos músculos esqueléticos, principalmente da região escapular e no miocárdio foram caracterizadas por necrose de miofibras de intensidade leve à moderada as vezes acompanhada de infiltrado mononuclear discreto. No terço final do esôfago havia principalmente substituição de fibras musculares lisas por células fibroblásticas e células adiposas. A coleta de sangue ovino foi efetuada em 24 propriedades em dezesseis municípios distribuídos nas três regiões estabelecidas. Dos 388 ovinos coletados, 250 foram positivos e 138 negativos para o teste de imunodifusão em ágar gel para o vírus da língua azul. Em Santa Catarina Língua Azul em ovinos é considerada uma doença sazonal que ocorre principalmente em épocas quentes e chuvosas (dezembro – abril). A sazonalidade coincide com a época do ano a qual o vetor *Culicoide* se reproduz. Ovinos que sobrevivem ao quadro agudo podem desenvolver sequelas como disfagia, emagrecimento progressivo e morte. O Vírus da Língua Azul está presente nas três regiões determinadas, porém é mais presente na região 2, quando comparado com as demais (1 e 3). Na região 3, onde as temperaturas são mais baixas, o vírus parece estar se instalando de forma gradativa, pois as condições climáticas atuais têm contribuído para proliferação do vetor e consequentemente a ocorrência da doença.

Palavras-chave: *Bluetongue*. Dilatação esofágica. Patologia. Emagrecimento progressivo.

ABSTRACT

QUEVEDO L.S. **Retrospective study and occurrence of the bluetongue virus in sheep in the state of Santa Catarina. 2020.** Dissertation (Master's Degree in Animal Science - Area of Concentration: Animal Health and Pathology) - State University of Santa Catarina. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2020.

The bluetongue virus is an *Orbivirus* belonging to the Reoviridae family, it is responsible for causing non-contagious disease in ruminants and transmits midge of the genus *Culicoides*. This study describes the epidemiological and clinical-pathological aspects of ten outbreaks of bluetongue in sheep, diagnosed over a period of ten years in the state of Santa Catarina, and to evaluate, through serological tests of immunodiffusion on agar gel, the occurrence of the bluetongue in the state of Santa Catarina. For the study the state was divided into three regions, West (region 1), Coast, Itajaí Valley, North Plateau (region 2) and Mountain / South Plateau (region 3). As quais foram selecionadas e classificadas conforme suas características climáticas. A enfermidade foi diagnosticada nos municípios de Chapecó, São José do Cedro, Planalto Alegre, Pouso Redondo, Orleans, Riqueza, São Ludgero, Bom Retiro, Nova Veneza e Campo Alegre entre os anos de 2009 a 2019. The sheep initially developed ulcerations of the nostril, lips and oral mucosa with crusting, locomotor difficulties, blackened diarrhea, coughing, regurgitation and vomiting followed by death. The course of the disease ranged from one to eight days, and those who did not die until the eighth day showed apparent recovery. According to information from the owners where the acute illness occurred, after 2-3 months, some sheep showed regurgitation of food and progressive weight loss. Macroscopically, multiple ulcers of one to five millimeters were observed on the palate, subcutaneous edema on the face, neck and side of the chest, hydrothorax and hydropericardium, pulmonary congestion and edema, petechial hemorrhages in the serous esophagus near the esophageal hiatus and focal hemorrhage in the initial third pulmonary artery. On microscopy, the main lesions observed in the esophagus, in the skeletal muscles, mainly in the scapular region and in the myocardium, were characterized by necrosis of light to moderate intensity myofibers, sometimes accompanied by a discrete mononuclear infiltrate. In the final third of the esophagus, there was mainly replacement of smooth muscle fibers by fibroblastic cells and fat cells. The collection of sheep blood was carried out in 24 farms in sixteen cities distributed in the three established regions. Of the 388 sheep collected, 250 were positive and 138 negative for the immunodiffusion test on agar gel for the bluetongue virus. In Santa Catarina, bluetongue in sheep is considered a seasonal disease that occurs mainly in hot and rainy seasons (december - april). Seasonality coincides with the time of year when the Culicoides vector reproduces. Sheep that survive the acute condition can develop sequelae such as dysphagia, progressive weight loss and death. The bluetongue virus is present in the three determined regions, but it is more present in region 2, when compared with the others (1 and 3). In region 3, where temperatures are lower, the virus seems to be installing itself gradually, as the current climatic conditions have contributed to the proliferation of the vector and consequently the occurrence of the disease.

Keywords: Bluetongue. Esophageal dilation. Pathology. Progressive weight loss.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Mapa geográfico de Santa Catarina com destaque dos municípios onde foram coletadas amostras de sangue ovino para o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).....**Erro! Indicador não definido.**4
- Figura 2 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – ovino, apático com orelhas caídas, cabeça baixa e debilidade de membros. B – ovino com múltiplas úlceras de aproximadamente 0,5 mm no focinho. C – ovino com lesões crostosas no focinho.....38.
- Figura 3 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – ovino, prostado com orelhas caídas e cabeça baixa. B – ovino em decúbito lateral com diarreia sanguinolenta.....38.
- Figura 4 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – mucosa oral de coloração azulada (cianótica) e com ulceração no pulvino dentário. B – hemorragia nasal.....39.
- Figura 5 - Ovino com sequelas resultantes do vírus língua azul. A – extravasamento de conteúdo alimentar pelas narinas. B – emagrecimento progressivo.....39.
- Figura 6 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – artéria pulmonar com hemorragia focal. B – cornetos – ulcerações múltiplas na mucosa nasal.....40.
- Figura 7 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – Edema subcutâneo. B – traqueia – espuma branca na luz do órgão. C - cavidade torácica – acúmulo de líquido livre na cavidade (hidrotórax). D – retículo e abomaso – ulcerações multifocais.....40.
- Figura 8 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – pulmões – aumento de tamanho, não colabado e congesto. B – hiato esofágico – hiperemia difusa, moderada.....41.
- Figura 9 - Ovino com diagnóstico de língua azul, esôfago medial - fibras musculares lisas de coloração eosinofílica (necrose) associado a infiltrado inflamatório mononuclear.....42.
- Figura 10 - Ovino com diagnóstico de língua azul, esôfago medial – infiltrado mononuclear moderado ao redor de vasos sanguíneos do esôfago.....42.
- Figura 11 - Ovino com diagnóstico de língua azul, coração. A — necrose de fibra muscular e infiltrado de células mononucleares. B - Ampliação de A.....43.
- Figura 12 - Ovino com e língua azul. Esôfago medial. A e B – necrose de fibras e substituição de tecido muscular liso por células mononucleares. C - Ampliação de A.....43.
- Figura 13 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A e B – hemorragia focalmente extensa em meio a fibras musculares.....43.
- Figura 14 - Ovino com diagnóstico de língua azul, pulmão – congestão difusa acentuada associada a infiltrado mononuclear discreto e a conteúdo amorfo, anfófilo (edema).....44.
- Figura 15 - Ovino com diagnóstico de língua azul, cornetos. A – congestão, acentuada, difusa, associada a erosões na mucosa e congestão difusa acentuada.....44.
- Figura 16 – Gráfico das temperaturas anuais médias dos últimos 4 anos nos municípios de Água Doce, Bom Retiro, São Joaquim, Nova Veneza, Campo Alegre, Irineópolis. E temperaturas anuais médias dos últimos 2 anos nos municípios de Chapecó e Lages.....47.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do teste de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase para o vírus da língua azul em ovinos no estado de Santa Catarina.....	45.
Tabela 2 – Número de animais positivos e negativos para o teste de imunodifusão em gel de ágar para o vírus da Língua Azul em ovinos por região.....	45.
Tabela 3 – Número de animais positivos e negativos para o teste de imunodifusão em gel de ágar para o vírus da língua azul por município e propriedade.....	46.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

BTV	<i>bluetongue</i>
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
CIRAM	Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
HE	Hematoxilina-eosina
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
LAPA	Laboratório de Patologia Animal
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
SV	Setor de Virologia
TRIzol	Life Technologies
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 HISTÓRICO.....	23
2.2 ETIOLOGIA.....	24
2.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE	25
2.4 SINAIS CLÍNICOS	26
2.5 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS	27
2.6 DIAGNÓSTICO	28
2.7 TRATAMENTO.....	29
2.8 CONTROLE.....	29
3 OBJETIVO	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE.....	59

1 INTRODUÇÃO

O vírus da língua azul (*bluetongue virus*, BTV) é um *Orbivirus* pertencente à família Reoviridae, é responsável por causar doença não-contagiosa em ruminantes como cervídeos silvestres, bovinos, caprinos e ovinos e tem como transmissor mosquitos do gênero *Culicoides* (BALDINI et al., 2018; BIANCHI et al., 2017; CLAVIJO et al., 2002; JENCKEL et al., 2015; KAWANAMI et al., 2018; WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008).

A forma clínica da doença é observada principalmente na espécie ovina. As demais espécies raramente desenvolvem sinais clínicos e quando observados são inespecíficos e comuns à outras doenças o que dificulta o diagnóstico clínico (WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008).

O nome língua azul é relacionado com a alteração de cor da língua dos animais, que nestes casos se tornam azuladas devido a hipóxia causada por lise das células endoteliais de vasos sanguíneos, cuja alteração é considerada característica da doença (HUTCHEON, 1893; ZACHARY, 2013).

A doença pode causar lesões no trato gastrointestinal e distúrbios reprodutivos como abortos e malformações (ANTONIASSI et al., 2010a; RIET-CORREA, 2007). As espécies bovina e caprina são consideradas menos susceptíveis quando comparadas com os ovinos (BACKX et al., 2007; DARPEL et al., 2007). No Brasil, o diagnóstico clínico de BTV em ovinos foi realizado no Paraná, no Rio de Janeiro, no Rio Grande do Sul e em Minas Gerais (BALARO et al., 2014; CLAVIJO et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2017; LIMA et al., 2016). Em Santa Catarina os primeiros casos de BTV em ovinos, foram diagnosticados e registrados no Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias (LAPA/CAV/UDESC), no município de Chapecó em 2009.

Este estudo tem como objetivo descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da doença língua azul por meio de estudos retrospectivos dos dados registrados no Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC, e avaliar através do teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) a circulação do vírus em ovinos nas diferentes regiões do estado de Santa Catarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos de BTV ocorreram no Sul da África, onde a doença era conhecida por *fever* ou *epizootic catarrhal* e posteriormente *malarial catarrhal fever of sheep* (SPREULL, 1905). Acreditava-se que a doença era causada por um parasito de hemácias (SPREULL, 1905). A partir de 1905, a doença foi denominada de *bluetongue*. Este nome foi dado em decorrência da coloração azulada causada pela hipóxia na língua dos animais afetados (HUTCHEON, 1893). Posteriormente, o vírus foi isolado no mar mediterrâneo, na ilha de Chipre, no ano de 1943. Acredita-se que a ilha tenha sido a porta de entrada da doença para o continente Europeu (GAMBLES, 1949). No século XX o vírus se espalhou para a América do Norte e Europa principalmente pela importação de bovinos e pela chegada de mosquitos infectados e no final dos anos 90 a doença chegou ao Sul da Europa (HATELEY, 2009). Hateley (2007), faz a associação da chegada do sorotipo 8 na Europa com o aumento da temperatura (5 °C) durante o verão de 2006 com surtos ocorridos em Maastricht, fronteira entre Holanda e Alemanha.

Na América do Norte a doença foi confirmada em 1953, embora haja suspeita de que o vírus já circulava no continente por volta de 1923, e era conhecida como “*soremuzzle*” ou “*coronitis*” (MCKERCHER et al., 1953; STAIR; ROBINSON; JONES, 1968). Na América do Sul, os primeiros relatos ocorreram no Brasil em 1978, onde foi detectado pela primeira vez em bovinos da raça Canchim a presença de anticorpos para o vírus em animais oriundos do município de São Carlos, São Paulo (SILVA, 1978).

Suspeita-se que os sorotipos virais e *Culicoides insignis* encontrados na América do Sul sejam isolados e observados na Bacia do Caribe sendo um indício de que a enfermidade possa ter se espalhado da América Central em direção a América do Sul (WALTON, 2004).

Um dos primeiros surtos da doença no continente asiático ocorreu no ano de 1964 na Índia onde foram realizados testes sorológicos na região com alta detecção de anticorpos contra o agente (SREENIVASULU; RAO, SUBBA; GARD, 1995). Na China no ano de 1979 foi descrita uma doença semelhante a BTV, porém, sem confirmação. Neste mesmo ano algumas medidas foram adotadas para realização de maiores estudos e investigação da enfermidade (NIANZU et al., 1995). Na Austrália as primeiras notificações sobre a circulação do vírus ocorreram em 1977 a partir de isolados de mosquitos Culicoides, entretanto sem associação com doença clínica (GEORGE et al., 1978).

A Antártica é o único continente onde o vírus não foi isolado (OIE, 2013; ROY; BOYCE; NOAD, 2009). Neste ambiente de frio intenso o vetor não consegue sobreviver se tornando inviável para o seu estabelecimento e perpetuação do vírus (OIE, 2013).

2.2 ETIOLOGIA

A família Reoviridae possui 15 gêneros. O *Orbivirus* é um destes gêneros o qual são conhecidas 22 espécies sendo um deles o vírus da língua azul (BTV). Ainda compõe este grupo doenças pouco conhecidas como a doença epizootica hemorrágica dos cervídeos, o vírus da peste equina, vírus da encefalose equina e vírus Palyam (ALFIERI et al., 2007; SIB, 2011).

Estes vírus medem 70 nm de diâmetro, sem envelope lipídico e possuem simetria icosaédrica, ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) e possuem genoma segmentado. Todos são resistentes a solventes lipídicos e sensíveis a desinfetantes a base de iodóforos e fenóis, estáveis em pH entre 6,5 e 8 e quando armazenados a temperaturas de 4 °C (ALFIERI et al., 2007; BATTEN et al., 2008).

O genoma do BTV possui 10 segmentos de dsRNA, divididos em três segmentos grandes (L1 a L3), três médios (M1, M2, M3) e, por fim, quatro pequenos (S1, S2, S3, S4) (ROY, 2006). O vírus possui ao todo sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e cinco proteínas não-estruturais (NS1 a NS5) (ALFIERI et al., 2007).

A camada interna do vírus possui de 52 nm de diâmetro e é composta pela VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7 (λ_1 , λ_2 , λ_3 , μ_2 , σ_2). Destas as mais abundantes são as VP7 e VP3 respectivamente sendo a VP3 de grande importância na integridade estrutural do núcleo viral sendo altamente conservada nos diferentes sorotipos e a VP7 como está exposta em regiões de superfície estimula a produção de anticorpos (ALFIERI et al., 2007; ROY, 2006).

A camada externa do BTV é composta pelas proteínas VP2 e VP5, as quais apresentam maior variação entre os sorotipos do gênero. A VP2 é mais variável quando comparada com a VP5 ambas são mais variáveis que as proteínas localizadas no núcleo do vírus (ALFIERI et al., 2007; ROY; BOYCE; NOAD, 2009).

O BTV possui 27 sorotipos e no Brasil os casos clínicos em ovinos estão associados aos sorotipos 1, 4, 12 e 17 (ANTONIASSI et al., 2010b; BIANCHI et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2017). Os sorotipos 3, 4, 18, 19 e 22 foram isolados de cervídeos com sinais clínicos no Paraná (BALDINI et al., 2018). Em bovinos o sorotipo 4 foi isolado de animais sem sinais clínicos (GROOCKOCK; CAMPBELL, 1982).

A espécie ovina é mais susceptível ao BTV, porém bovinos são considerados reservatórios e podem desenvolver sinais clínicos mais brandos. Camelídeos e veados também são susceptíveis e podem apresentar alguns sinais clínicos (BALDINI et al., 2018).

O vírus é inoculado no ovino por mosquitos do gênero *Culicoides* sp. (maruim, pólvora, borrachudo e mosquito do mangue) e insetos como *Aedes lineatopennis*, *Omithodores coriaceus*, *Melophagus ovinus*, também são apontados como transmissores (RIET-CORREA, 2007).

2.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE

A inoculação em ovinos ocorre geralmente nos meses de verão e outono em locais de clima temperado, quando há grandes volumes de chuvas ou acúmulo de água propiciando maior proliferação do transmissor do vírus (FILHO et al., 2018). Após a inoculação o vírus se associa em macrófagos e quando estes se depositam na membrana basal dos vasos, se rompem devido à infecção pelo vírus e posteriormente, adentra às células endoteliais e causa necrose local (ZACHARY, 2013).

O período entre inoculação e desenvolvimento dos primeiros sinais clínicos é de aproximadamente 5-10 dias (OIE, 2013). Após a inoculação do vírus, a proteína responsável pela entrada na célula do hospedeiro é a VP2, a qual entra em contato com a membrana celular ocorrendo endocitose e as proteínas VP2 e VP5 do capsídeo são perdidas (ROY; BOYCE; NOAD, 2009). Este processo é importante para que ocorra a ativação da transcriptase viral. Logo a síntese das proteínas da célula é reprimida e em aproximadamente 9-11 horas pós-infecção a síntese de proteínas virais atinge seu pico, e em seguida diminui até a morte celular de forma progressiva (ALFIERI et al., 2007).

A VP6 atua desenrolando os componentes do duplex de RNA genômico ao mesmo tempo em que a VP1 inicia a produção de moléculas de RNA de sentido positivo que são utilizadas como mRNA para síntese proteica, os mRNA semi-integros chegam ao citoplasma onde irá ocorrer a tradução. Os vírions são montados gradativamente e a VP2 e VP5 são adicionadas na periferia dos corpúsculos formados durante o processo (ALFIERI et al., 2007).

2.4 SINAIS CLÍNICOS

O BTV pode se manifestar de formas diferentes dependendo do sorotipo e da espécie acometida. A viremia é de aproximadamente 50 dias em ovinos e entre 28-41 dias em caprinos. Nos bovinos a viremia é de aproximadamente 100 dias, geralmente são assintomáticos e, por este motivo se tornam um importante reservatório do vírus. Um dos mecanismos de proteção do vírus contra anticorpos neutralizantes é a forma de circulação, pois no período de viremia ele circula intimamente associado a membrana dos eritrócitos. A maioria dos Culicoides possui preferência para sangue bovino quando comparados com ovinos e caprinos, sendo este um fator epidemiológico importante na ocorrência ou não da doença (ALFIERI et al., 2007).

As manifestações clínicas em ovinos podem ser inespecíficas e comuns de outras enfermidades, normalmente observa-se anorexia, hipoproteïnemia, perda da condição corporal, febre, prostração, letargia, hiporexia, fezes secas, arqueamento. No trato respiratório as principais manifestações são tosse, espirros, secreção nasal seromucosa, esverdeada por vezes sanguinolenta com lesões crostosas, respiração dificultosa e profunda em animais que apresentam edema pulmonar grave. No trato digestivo é comum haver inchaço labial, hipomotilidade ruminal, úlceras e erosões na cavidade oral. Outras manifestações clínicas também podem ser observadas como claudicação e hiperemia da banda coronariana, com manifestações de fraqueza secundária a necrose muscular (BALARO et al., 2014; BIANCHI et al., 2017; LIMA et al., 2016; MACLACHLAN et al., 2009; WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008).

Em estudo experimental em ovinos com inoculação do BVT-4, os animais além dos sinais supracitados também desenvolveram edema facial, liberação de espuma pela boca, necrose extensa da almofada dentária, congestão difusa da língua com áreas focalmente extensas de hemorragia, ulceração e coloração azul escura (MACLACHLAN et al., 2008). Os lábios e a língua podem estar doloridos, o que dificulta a apreensão de alimentos. Em alguns casos os animais apresentam diarreia, sede e marcha caracterizada por dor, além de regurgitação e descarga nasal de conteúdo alimentar que por vezes é aspirado causando pneumonia. Nesta espécie de acordo com Spreull (1905), a doença pode ser dividida na forma aguda, subaguda e abortiva, pois este mesmo autor afirma que não existe forma crônica apesar dos animais morrerem tardiamente. Pode ocorrer aborto em qualquer fase de gestação. Os fetos que são infectados entre 40 – 80 dias podem desenvolver hidrocefalia ou outras alterações cerebrais bem como displasia de retina e outras alterações teratogênicas (ALFIERI et al., 2007).

Em bovinos o vírus geralmente não causa doença clínica. Na Europa há registro de um surto associado ao sorotipo-8 (WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008). Terneiros infectados congenitamente desenvolveram edema córneo após a ingestão do colostro. Acredita-se que este sinal clínico seja em decorrência a deposição de imunocomplexos em vasos sanguíneos da câmara anterior do olho (HOLZHAUER; VOS, 2009). As lesões endoteliais podem desencadear coagulação vascular disseminada. Esta coagulopatia pode evoluir para diátese hemorrágica que também é observada em ovinos (WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008).

Em bovinos adultos os principais sinais clínicos observados são conjuntivite, lacrimejamento, salivação e secreção nasal, hiperemia e hemorragias nas superfícies mucosas orais e nasais, crostas e descamação em focinho, hiperemia e ulceração dos tetos, coronite, claudicação e relutância em caminhar. Alguns sinais inespecíficos como pirexia, mal-estar e inapetência também podem ser observados (WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008).

Geralmente ocorre morte embrionária de fetos bovinos infectados com 150 dias ou, nascimento de terneiros com malformações neurológicas, hidrocefalia e cegueira. Os que são infectados mais tardiamente nascem normais, ou, podem apresentar viremia mais prolongada. Há evidências de que alguns sorotipos possuem maior predileção ao útero gravídico e podem resultar em infecção do feto (ALFIERI et al., 2007).

2.5 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS

As principais alterações macroscópicas encontradas na necropsia são observadas principalmente no trato respiratório e digestivo. No trato respiratório normalmente há corrimento nasal esverdeado seromucoso ou apenas mucoso. Nos pulmões observa-se edema pulmonar (órgão aumentado, não colapsado, pesado, vermelho e brilhante, por vezes com impressões das costelas), consolidação pulmonar cranioventral além de espuma e conteúdo alimentar na luz da traqueia e brônquios (ANTONIASSI et al., 2010b; BIANCHI et al., 2017; LIMA et al., 2016; MACLACHLAN et al., 2009).

As lesões no trato digestivo superior consistem em edema labial com áreas hemorrágicas e ulcerações, que podem se estender ao palato duro. Pode haver edema da língua e a mesma pode, eventualmente, apresentar-se cianótica (característica que dá o nome a doença) pode ocorrer úlceras na superfície dorsal. No esôfago frequentemente há dilatação com áreas de hemorragia na adventícia e no rúmen, retículo omaso e abomaso pode haver hemorragias e

ulcerações na mucosa (ANTONIASSI et al., 2010a; BALARO et al., 2014; BIANCHI et al., 2017; MACLACHLAN et al., 2008, 2009).

Algumas alterações cardiovasculares são observadas e são caracterizadas por hemorragias epicárdicas e endocárdicas principalmente no ventrículo esquerdo, hidropericardio além de hemorragia na válvula mitral e na base da artéria pulmonar (ANTONIASSI et al., 2010a; BIANCHI et al., 2017; MACLACHLAN et al., 2009).

Linfonodos mesentéricos e mediastínicos podem estar reativos, aumentados e a musculatura esquelética pode estar pálida com fibras musculares necróticas e com áreas hemorrágicas (ANTONIASSI et al., 2010a; BIANCHI et al., 2017).

Na microscopia a lesão característica da doença é observada nos músculos estriados do esôfago e consiste em degeneração flocular e necrose hialina, com núcleos picnóticos, fibras fragmentadas e por vezes há infiltrado inflamatório linfohistiocítico em meio a fibras necróticas (ANTONIASSI et al., 2010a; BALARO et al., 2014; BIANCHI et al., 2017). Também é descrito no esôfago áreas multifocais de hemorragia e mineralização das fibras necróticas, além de células gigantes multinucleadas. Estas lesões também são observadas em músculos respiratórios, língua e coração (ANTONIASSI et al., 2010a; BALARO et al., 2014; BIANCHI et al., 2017). No músculo cardíaco e esquelético também pode ser observado necrose individual de miofibras (ANTONIASSI et al., 2010a; BIANCHI et al., 2017). Nos pulmões de animais acometidos observa-se material hialino no interior dos alvéolos, brônquios e bronquíolos, associado a neutrófilos, fibrina e conteúdo alimentar e infecção bacteriana secundária (ANTONIASSI et al., 2010b; BALARO et al., 2014; BIANCHI et al., 2017). Necrose do parênquima pulmonar pode ser observada com septos interlobulares espessos e congestão de capilares (BIANCHI et al., 2017). Em rúmen e retículo pode haver úlceras e erosões do epitélio cobertas por fibrina, neutrófilos intactos e degenerados, eritrócitos, detritos celulares além de degeneração vacuolar de células epiteliais. O infiltrado inflamatório perivascular linfohistiocitário e neutrofílico normalmente são visualizados na mucosa/lâmina própria destes órgãos. Linfonodos e baço microscopicamente são caracterizados por hiperplasia linfoide (BIANCHI et al., 2017).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da enfermidade pode ser determinado de forma direta por meio de técnicas como cultivos celulares em camundongos lactentes, inoculação em ovo, ou, em ovinos, imunofluorescência, imuno-histoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR) ou hibridação

in situ e imunodifusão em ágar gel (RADOSTITS et al., 2002; RIET-CORREA, 2007). Alternativamente pode ser realizado o diagnóstico de maneira indireta, através de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) a qual é a mais utilizada, reação de fixação de complemento, imunofluorescência indireta e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), também podem ser empregadas (FILHO et al., 2018; RIET-CORREA, 2007). Geralmente são realizadas duas coletas de soro para realização de teste pareado para confirmação da doença com um intervalo de 3-4 semanas (RIET-CORREA, 2007). Na IDGA são detectados anticorpos de cinco a quinze dias após a infecção e podem permanecer dois anos ou mais nos animais, é um teste considerado mais em conta, porém é um teste de baixa sensibilidade, pode detectar anticorpos de reação cruzada com outros orbivírus (RADOSTITS et al., 2002).

Os principais diagnósticos diferenciais do BTV devem ser realizados com doenças que acometem o sistema respiratório, gastrointestinal e necrose em musculatura como aftosa, ectima contagioso e distrofia muscular nutricional (deficiência de vitamina E e Selênio) (ANTONIASSI et al., 2010a; RADOSTITS et al., 2002; WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008).

2.7 TRATAMENTO

Preconiza-se tratamento de suporte mesmo que não seja muito eficiente (BIANCHI et al., 2017). Soluções desinfetantes suaves nos locais acometidos podem resultar em alívio. Abrigar os animais em locais protegidos do sol, terapia com líquidos, eletrólitos além de tratamento para o controle de infecção secundária (RADOSTITS et al., 2002). Este tratamento pode ser realizado com antibióticos de amplo espectro e anti-inflamatório não esteroide com o intuito de controlar a inflamação, febre e dor, com uma aplicação durante 3-5 dias (BIANCHI et al., 2017).

2.8 CONTROLE

Para controlar a enfermidade, países da Europa estão utilizando vacinação, entretanto estas vacinas estão sendo responsabilizadas por causar abortos e malformações se aplicadas em 30-60 dias de gestação (RIET-CORREA, 2007). Outra forma de evitar a ocorrência da doença no rebanho adotando algumas medidas como aquisição de animais sorologicamente negativos para o vírus, e controle da proliferação do mosquito transmissor (FILHO et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar por meio de estudo retrospectivo de registros do Laboratório de Patologia Animal CAV/UEDESC a ocorrência da doença língua azul em rebanhos de ovinos nas diferentes regiões do estado de Santa Catarina.

Avaliar através do teste IDGA a circulação do vírus da língua azul em ovinos no estado de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Caracterizar a epidemiologia, sinais clínicos e achados macroscópicos e microscópicos causados pelo vírus em ovinos, no estado de Santa Catarina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

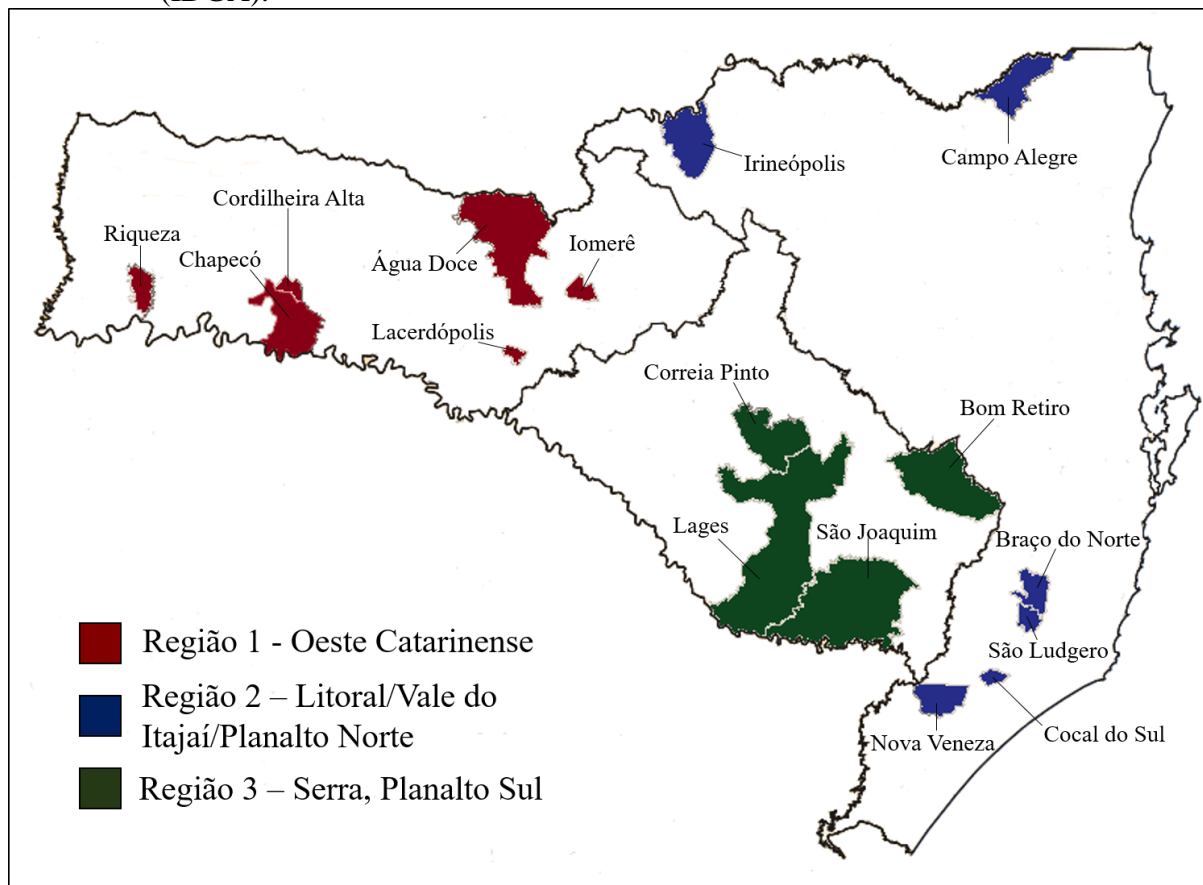
Os dados epidemiológicos e clínico-patológicos foram obtidos em dez propriedades onde a doença ocorreu. Seis ovinos foram necropsiados e diagnosticados na forma aguda e sete na forma crônica. Fragmentos de encéfalo, pulmão, coração, aorta, fígado, baço, linfonodos, esôfago, rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado, intestino grosso, rins, bexiga, e músculo esquelético das regiões escapular e glútea, foram coletados, fixados em formol a 10%, processados rotineiramente e corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica.

Amostras de sangue de ovinos com sinais clínicos da doença provenientes de seis propriedades, foram coletadas com EDTA, congeladas e encaminhadas ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (SV-UFSM). As amostras das propriedades 1 - São Ludgero (5), 2 - Bom Retiro (22) e 3 - Riqueza (2) foram processadas em um *pool* para cada respectiva propriedade, já as propriedades 4 - Nova Veneza (1), 5 - Chapecó (1) e 6 - Campo Alegre (1) apenas uma amostra foi obtida e enviada. Estas foram submetidas à extração de RNA utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração do RNA, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa GoScript™ (Promega). O cDNA foi mantido na temperatura de -80 °C até sua utilização.

A técnica de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), foi realizada para amplificação de um fragmento de 113 bp do gene da proteína VP1 com a utilização dos *primers*: F-BTV-VP1: GCGAAGTGTGGACATGAAGC e R-BTV-VP1: TCCTGCGGTACGTAACAACC. As reações de RT-PCR foram realizadas em total de 25 µl, utilizando 1 mM de MgCl₂, 100 µM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µM de cada primer, 2 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), 10% do volume total de tampão da polimerase, 2 µL de cDNA molde e água q.s.p., que foram submetidas as seguintes condições de ciclagem: 45 °C por 10 min, 95 °C por 10 min, seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Em cada reação foram utilizados controles negativo (água milli-Q) e positivo. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 80 Volts por 40 minutos, e visualizados em transiluminador.

Para avaliação pela técnica de IDGA foi realizada coleta de sangue dos ovinos, de acordo com a temperatura média nas três regiões do estado de Santa Catarina: 1 - Oeste, 2 - Litoral/Vale do Itajaí/Planalto Norte (mais quente), e 3 - Serrana - Planalto Sul (mais fria), (Figura 1).

Figura 1 - Mapa geográfico de Santa Catarina com destaque dos municípios onde foram coletadas amostras de sangue ovino para o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).



Do total de 221.509 cabeças de ovinos do estado de Santa Catarina, foram coletadas amostras de sangue de 388 (0,17%) ovinos, assim distribuídos: região 1 (105.523 ovinos / 181 amostras), região 2 (70.886 ovinos / 129 amostras) e região 3 (45.100 ovinos / 78 amostras).

Com base no número total de ovinos no estado de Santa Catarina, admitiu-se prevalência esperada de 50%, proporção esta que maximiza o tamanho da amostra e garante confiança mínima de 95% e erro estatístico de 5%, o qual favorece um (n) de 384 animais (THRUSFIELD, 2004).

A coleta de sangue ovino foi efetuada em 24 propriedades, em dezesseis municípios de acordo com a Fig.2. As amostras de sangue foram obtidas por punção de jugular, com tubo a vácuo de 10 ml e centrifugado em 2000 RPM e realizado protocolo preconizado pelo *kit* comercial Veterinary Medical Research e Delopment, bluetongue virus antibody test kit, Pullman, WA, USA, por meio do teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA).

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC), protocolo 5097130319.

5 RESULTADOS

O diagnóstico de BTV foi realizado em propriedade dos municípios de Chapecó, São José do Cedro, Planalto Alegre, Pouso Redondo, Orleans, Riqueza, São Ludgero, Bom Retiro, Nova Veneza e Campo Alegre entre os anos de 2009 a 2018.

O primeiro surto diagnosticado ocorreu no município de Chapecó. O produtor havia adquirido ovinos da raça Lacaune oriundos de uma propriedade do Rio Grande do Sul, um ano antes dos animais desenvolverem os sinais clínicos. O rebanho totalizava 900 ovinos, 600 da raça Lacaune e os demais das raças Milchschaft, e mestiços (Lacaune, Texel e Ile de France). Entre fevereiro e abril de 2009, 20 animais adoeceram e 15 morreram no período de 30 dias. A doença foi observada somente nos ovinos da raça Lacaune que eram criados soltos em piquetes. Todos os animais da raça Milchschaft eram soltos em piquetes durante o dia e estabulados à noite e os mestiços permaneciam fechados em galpões em todo o período e não adoeceram. Os animais morreram de três à oito dias após a observação dos primeiros sinais clínicos. A doença retornou no verão e outono de 2010. Neste mesmo ano a doença foi diagnosticada também em Planalto Alegre e São José do Cedro. Posteriormente, outros surtos foram diagnosticados clinicamente: Orleans (2014), Pouso Redondo (2015), Riqueza (2017), São Ludgero, Bom Retiro, Nova Veneza e Campo Alegre (2018).

Os sinais clínicos observados caracterizaram-se por apatia, hipertermia de 39,5-40,5°C, hiperemia da mucosa nasal e labial acompanhado de secreção nasal serosa (Fig. 2). Alguns apresentavam edema na região facial, dificuldade respiratória, restos de conteúdo ruminal nas narinas, intensa salivação e secreção ocular purulenta. Em estágios avançados havia ulcerações da narina, lábios e mucosa oral com formação de crostas, dificuldade locomotora, diarreia enegrecida, tosse e regurgitamento seguido de morte (Fig. 2-3-4). O curso da doença variou de um a oito dias, e os que não morreram até o oitavo dia mostraram recuperação aparente. De acordo com os proprietários onde a doença aguda ocorreu, após 2-3 meses, alguns ovinos mostraram regurgitação de alimento e emagrecimento progressivo (Figura 5). Destes, um foi necropsiado em Bom Retiro (animal adquirido de Chapecó), um em Riqueza e cinco em São Ludgero.

Figura 2 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – ovino, apático com orelhas caídas, cabeça baixa e debilidade de membros. B – ovino com múltiplas úlceras de aproximadamente 0,5 mm no focinho. C – ovino com lesões crostosas no focinho.

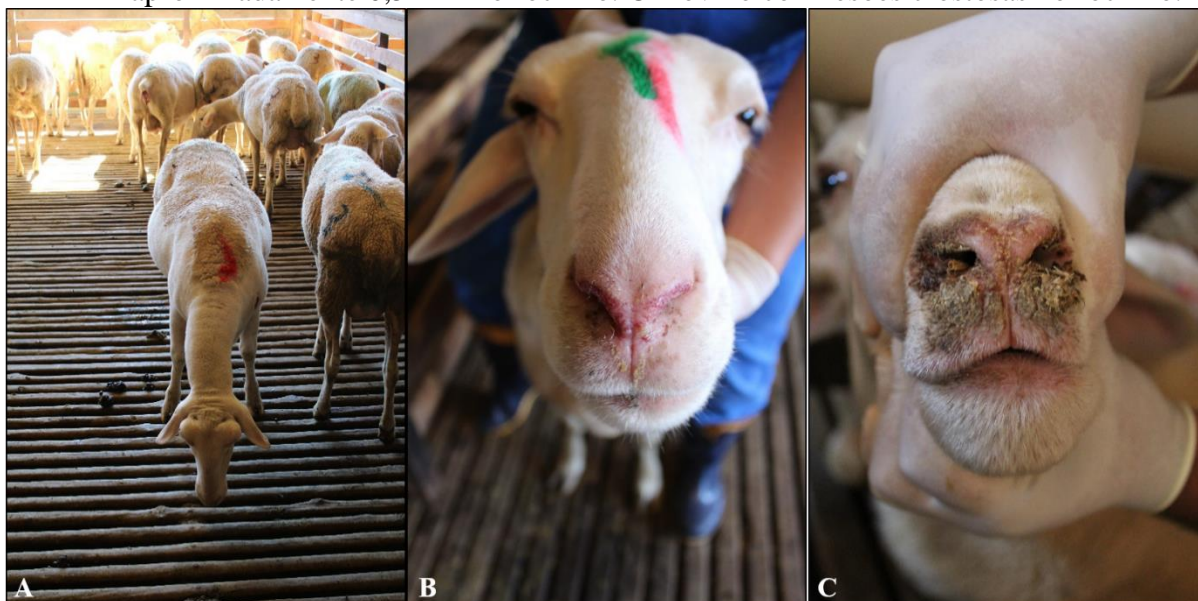


Figura 3 – Ovino com diagnóstico de língua azul. A – ovino, prostado com orelhas caídas e cabeça baixa. B – ovino em decúbito lateral com diarreia sanguinolenta.



Dos seis ovinos necropsiados no período de doença aguda, dois morreram naturalmente, três e cinco dias após o início dos sinais clínicos e quatro foram eutanasiados. Os sete ovinos que manifestaram regurgitação e emagrecimento progressivo foram eutanasiados entre dois e três meses após o início dos sinais clínicos. As principais lesões macroscópicas foram múltiplas úlceras de um à cinco milímetros no palato, edema subcutâneo na face, pescoço e lateral do tórax, hidrotórax e hidropericardio, congestão e edema pulmonar, hemorragias petequiais na serosa do esôfago próximo ao hiato esofágico, hemorragia focal no terço inicial da artéria pulmonar e múltiplas úlcera na mucosa da cavidade nasal (cornetos) (Figura 6-7-8). Ulcerações

de 1 à 2 cm foram observadas nos limites entre rúmen, retículo e omaso (Figura 7), além de esplenomegalia.

Figura 4 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – mucosa oral de coloração azulada (cianótica) e com ulceração no pulvino dentário. B – hemorragia nasal.



Figura 5 - Ovino com sequelas resultantes do vírus língua azul. A – extravasamento de conteúdo alimentar pelas narinas. B – emagrecimento progressivo.



Figura 6 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – artéria pulmonar com hemorragia focal. B – cornetos – ulcerações múltiplas na mucosa nasal.

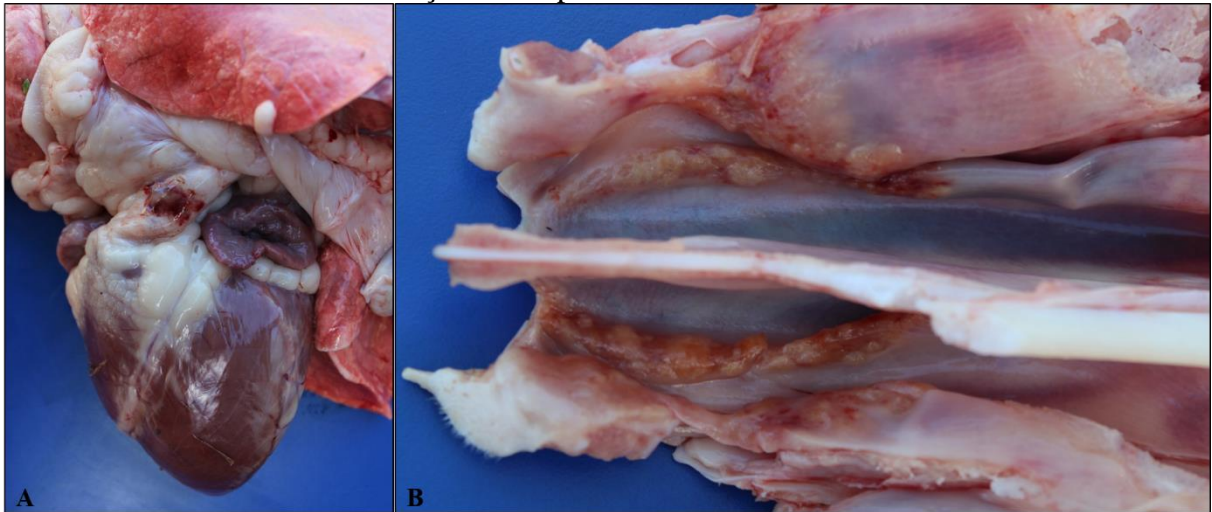


Figura 7 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – Edema subcutâneo. B – traqueia – espuma branca na luz do órgão. C - cavidade torácica – acúmulo de líquido livre na cavidade (hidrotórax). D – retículo e abomaso – úlceras multifocais.

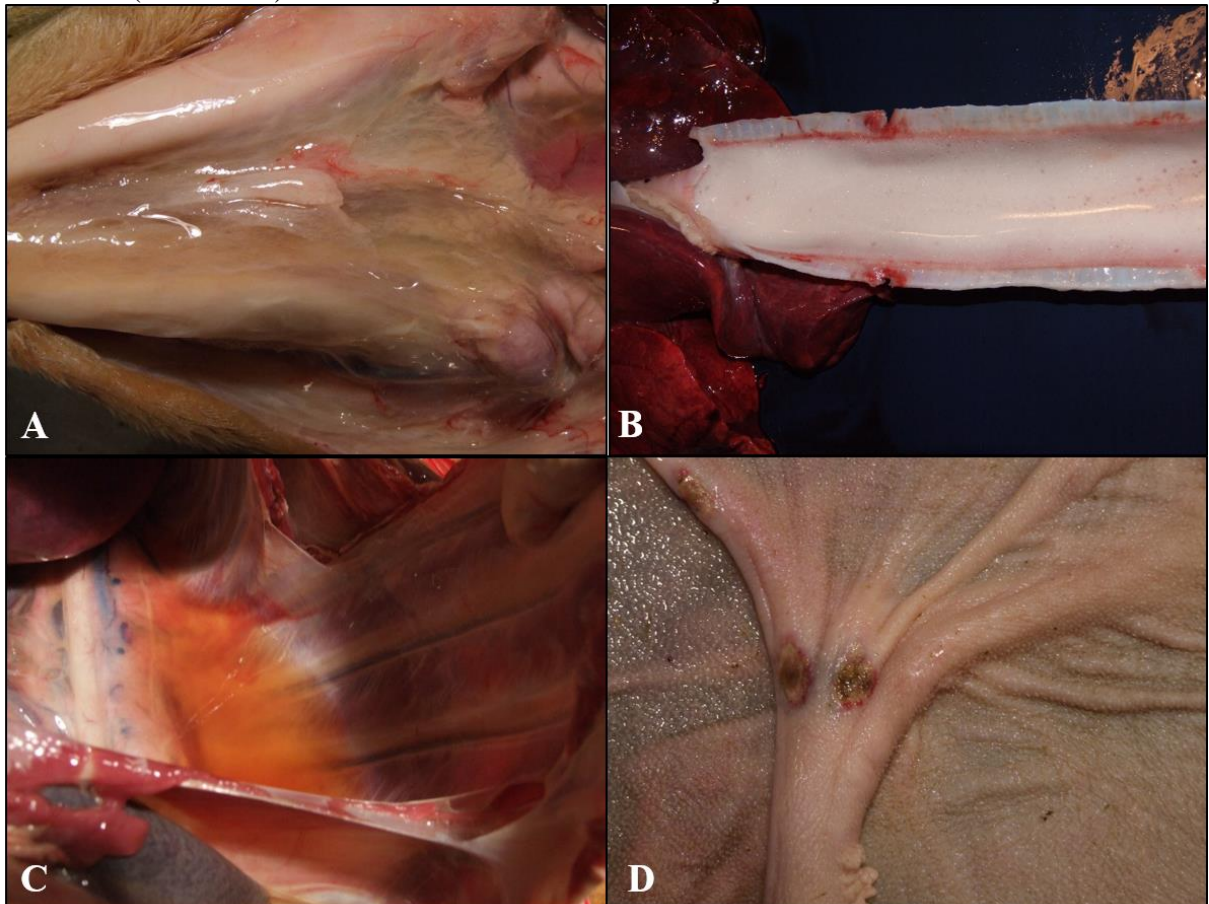
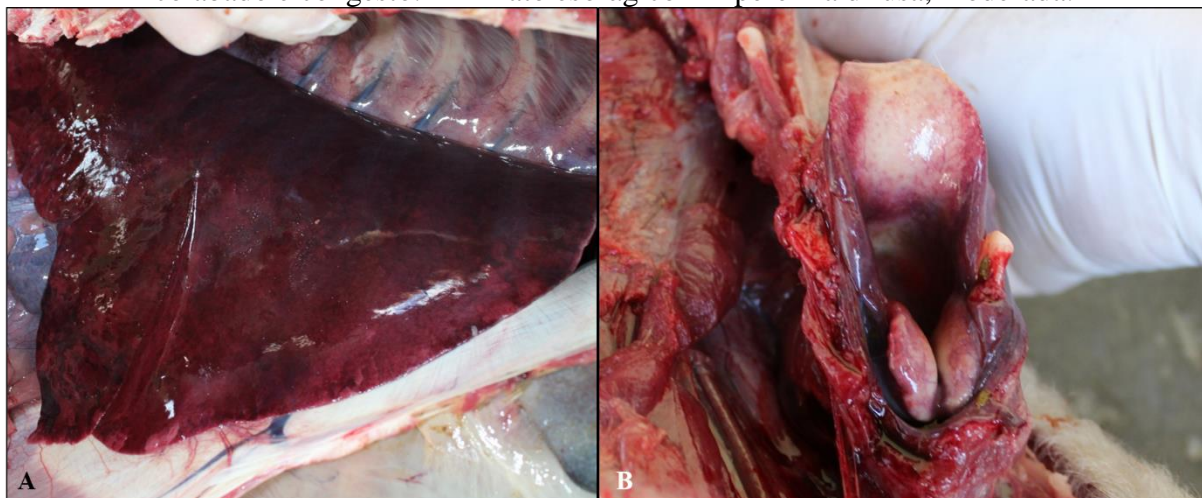


Figura 8 - Ovino com diagnóstico de língua azul. A – pulmões – aumento de tamanho, não colabado e congesto. B – hiato esofágico – hiperemia difusa, moderada.



Na histopatologia, nas mucosas nasal, oral, do rúmen, do retículo e do omaso havia necrose multifocal, moderada a acentuada, as vezes acompanhada de grande quantidade de *debris* celulares, colônias bacterianas e infiltrado predominantemente de neutrófilos foram observados. No esôfago, nos músculos esqueléticos, principalmente da região escapular e no miocárdio foi observado necrose discreta à moderada de miofibras as vezes acompanhada de infiltrado mononuclear leve (Figura 9-10-11). No terço final do esôfago havia principalmente substituição de fibras musculares lisas por células fibroblásticas e células adiposas (Figura – 12). Na artéria pulmonar do coração, havia hemorragia focalmente extensa (Figura - 13). Nos pulmões e baço havia congestão acentuada e hemorragia multifocal (Figura 14). Nos linfonodos mediastínicos e mesentéricos observou-se edema moderado, principalmente na região medular e hemorragia multifocal acompanhada de infiltrado de macrófagos e de neutrófilos. Nos demais órgãos não foram observadas alterações.

Figura 9 - Ovino com diagnóstico de língua azul, esôfago medial - fibras musculares lisas de coloração eosinofílica (necrose) associado a infiltrado inflamatório mononuclear.

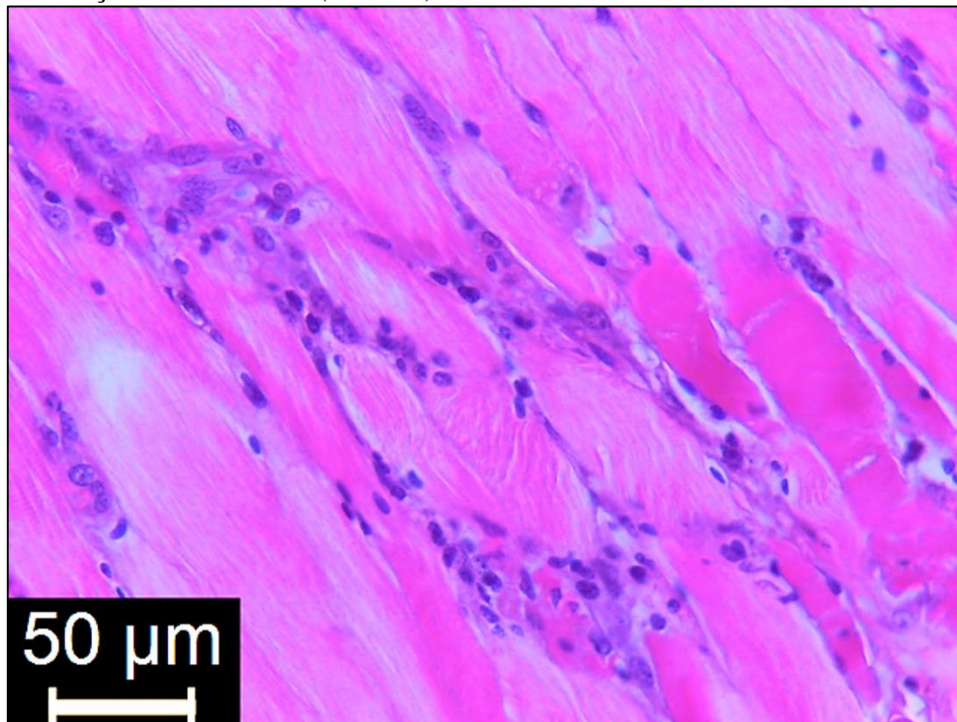


Figura 10 - Ovino com diagnóstico de língua azul, esôfago medial – infiltrado mononuclear moderado ao redor de vasos sanguíneos do esôfago.

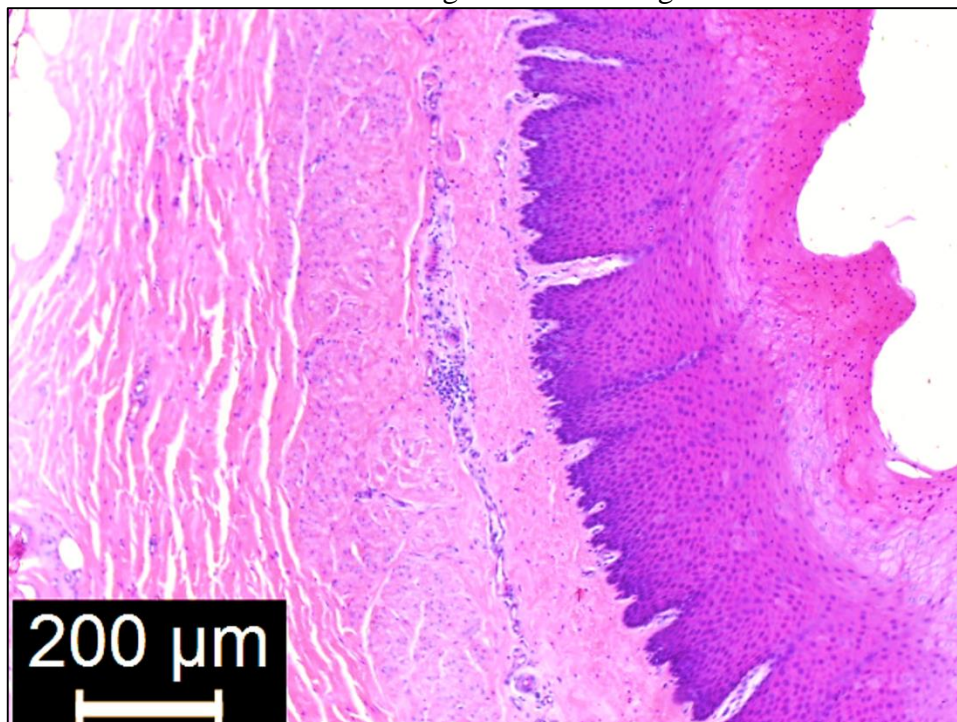


Figura 11 - Ovino com diagnóstico de língua azul, coração. A — necrose de fibra muscular e infiltrado de células mononucleares. B — Ampliação de A

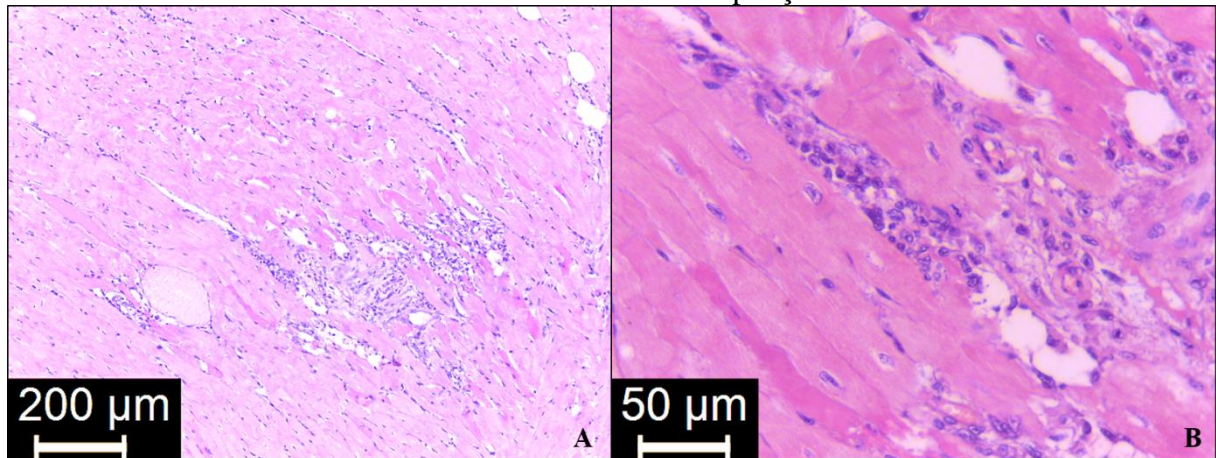


Figura 12 - Ovino com e língua azul. Esôfago medial. A e B – Necrose de miofibras e substituição de tecido muscular liso por células mononucleares. C – Ampliação de A.

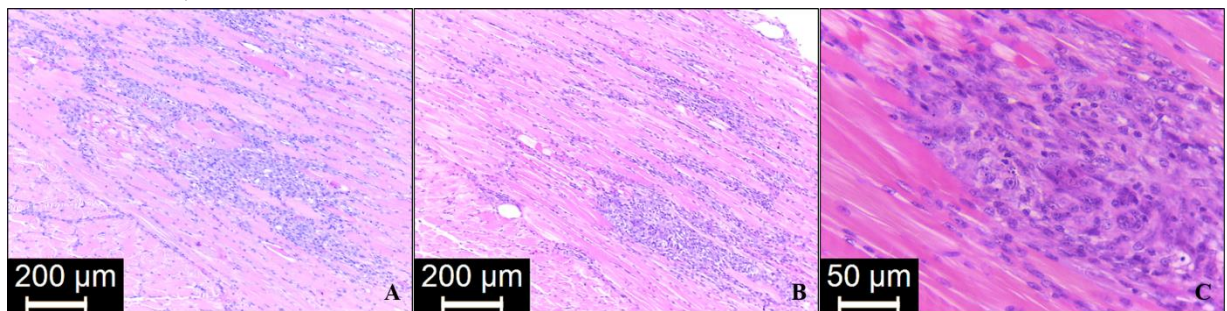


Figura 13 - Ovino com diagnóstico de língua azul, artéria pulmonar. A e B – hemorragia focalmente extensa em meio a fibras musculares..

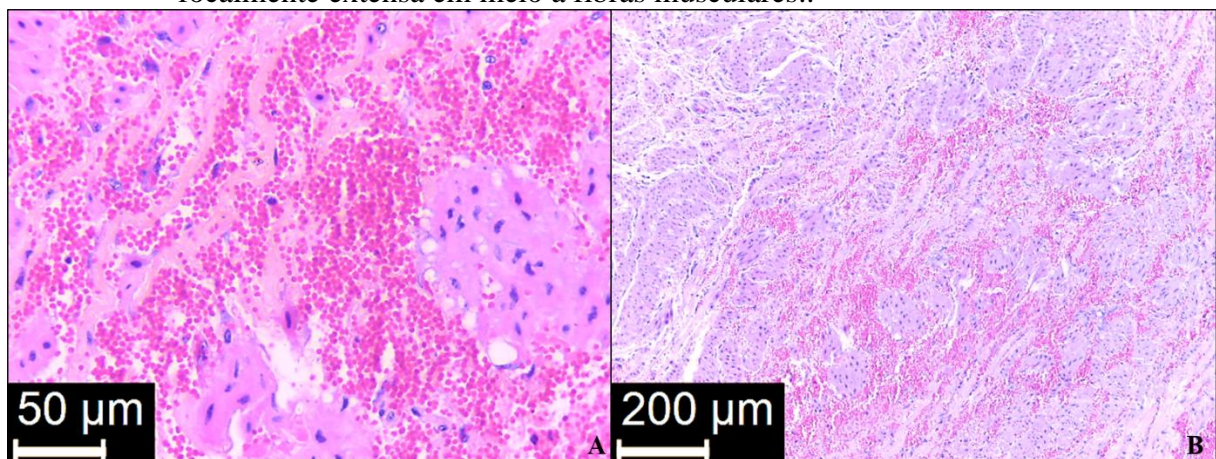


Figura 14 - Ovino com diagnóstico de língua azul, pulmão – congestão difusa acentuada associada a infiltrado mononuclear discreto e a conteúdo amorfo, anofílico (edema).

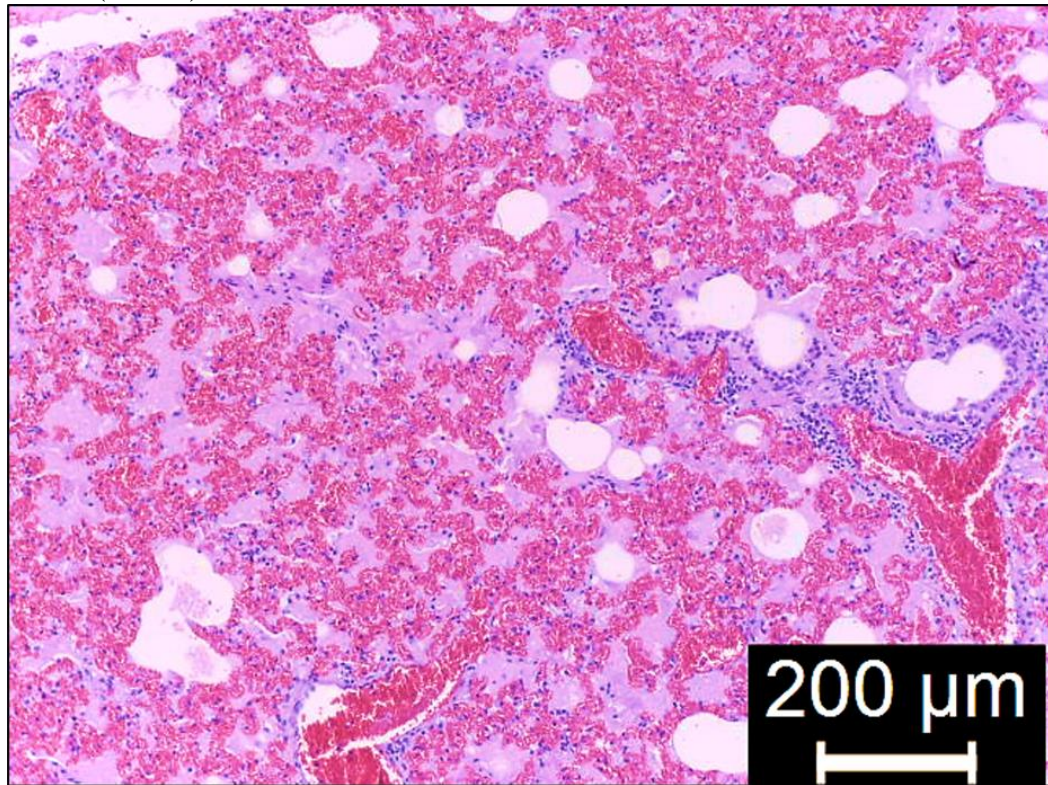
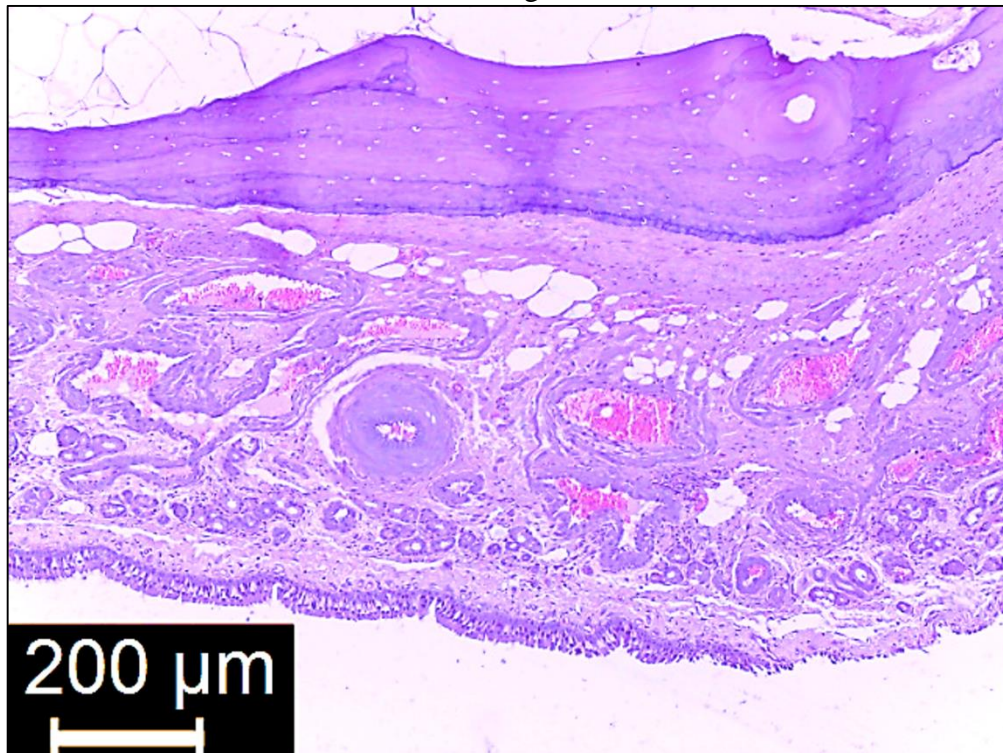


Figura 15 - Ovino com diagnóstico de língua azul, cornetos. A – congestão, acentuada, difusa, associada a erosões na mucosa e congestão difusa acentuada.



Por meio da técnica de RT-PCR realizada com as amostras de sangue se obteve resultado positivo para o gene da proteína VP1 do Vírus da Língua Azul em três propriedades (1 - São Ludgero, 3 - Bom Retiro e 6 - Campo Alegre) das seis investigadas (3/6 - 50%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados do teste de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase para o vírus da língua azul em ovinos no estado de Santa Catarina.

Propriedade	Número de mostras	Resultado
1 - São Ludgero	5	Positivo
2 - Nova Veneza	1	Negativo
3 - Bom Retiro	22	Positivo
4 – Riqueza	2	Negativo
5 – Chapecó	1	Negativo
6 - Campo Alegre	1	Positivo

As coletas foram realizadas em dezesseis municípios distribuídos nas três regiões. Dos 388 ovinos coletados, 250 foram positivos e 138 negativos no teste de IDGA para o BTV (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Número de animais positivos e negativos para o teste de imunodifusão em gel de ágar para o vírus da Língua Azul em ovinos por região.

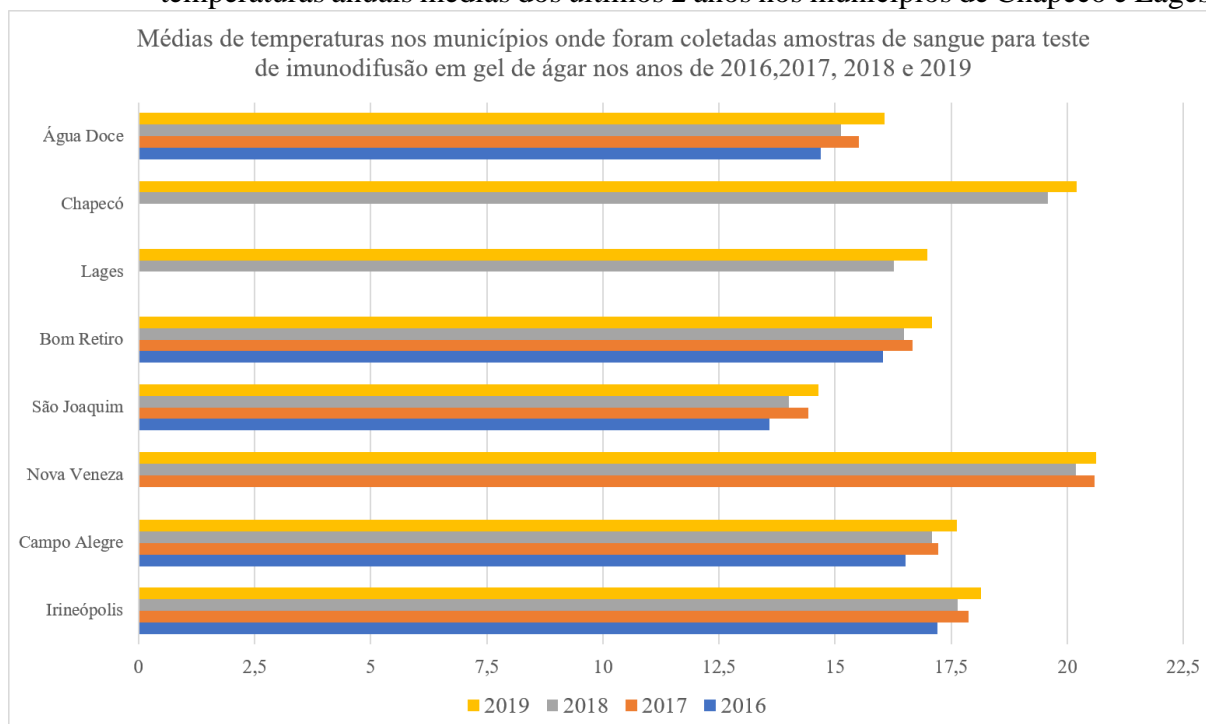
Região	Positivo	Negativo	Total
Região 1	105 (58,01%)	76 (19,58%)	181 (46,64%)
Região 2	119 (92,24%)	10 (7,75%)	129 (33,24%)
Região 3	26 (33,33%)	52 (66,66%)	78 (20,10%)
Total	250	138	388

Tabela 3 – Número de animais positivos e negativos para o teste de imunodifusão em gel de ágar para o vírus da língua azul por município e propriedade.

Município/propriedade	Região ^a	Nº animais positivos	Nº animais negativos	TOTAL
Riqueza (1)	1	5	0	5
Riqueza (2)	1	6	0	6
Riqueza (3)	1	7	1	8
Chapecó (4)	1	5	14	19
Cordilheira Alta (5)	1	5	0	5
Lacerdópolis (6)	1	22	1	23
Lacerdópolis (7)	1	15	0	15
Lacerdópolis (8)	1	10	5	15
Água Doce (9)	1	2	11	13
Água Doce (10)	1	2	19	21
Água Doce (11)	1	12	19	31
Iomerê (12)	1	14	6	20
Nova Veneza (13)	2	9	1	10
Nova Veneza (14)	2	3	1	4
Cocal do Sul (15)	2	11	1	12
São Ludgero (16)	2	25	0	25
Braço do Norte (17)	2	25	1	26
Braço do Norte (18)	2	10	0	10
Irineópolis (19)	2	17	6	23
Campo Alegre (20)	2	19	0	19
São Joaquim (21)	3	0	7	7
Bom Retiro (22)	3	22	15	37
Lages (23)	3	3	15	18
Correia Pinto (24)	3	1	15	16
TOTAL (24)	3	250	138	388

a - Região 1 – Oeste; Região 2 – Litoral/ Vale do Itajaí/ Planalto Norte; Região 3 - Serra Catarinense/ Planalto Sul.

Figura 16 – Gráfico das temperaturas anuais médias dos últimos 4 anos nos municípios de Água Doce, Bom Retiro, São Joaquim, Nova Veneza, Campo Alegre, Irineópolis. E temperaturas anuais médias dos últimos 2 anos nos municípios de Chapecó e Lages.



Fonte: EPAGRI/CIRAM (2020).

6 DISCUSSÃO

Língua Azul em ovinos no estado de Santa Catarina ocorreu em regiões de menor altitude como Oeste e Litoral. Na região Serrana a doença foi observada recentemente no ano de 2019. O aumento das temperaturas anuais médias dos últimos anos provavelmente tenha contribuído para a disseminação do vetor na região Serrana. As baixas temperaturas observadas nos anos anteriores provavelmente tenham dificultado a proliferação do *Cullicoide* sp. nesta região. Em dois surtos, um no Oeste e outro no Alto Vale do Itajaí os ovinos doentes eram provenientes da região Serrana e haviam sido adquiridos poucas semanas antes, fato este que pode ser explicado pela não proliferação do mosquito transmissor da LA na região de origem.

O curso clínico do BTV em ovinos pode variar de agudo a crônico. Nos casos agudos os animais morrem em sete a nove dias pós infecção, como resultado do edema pulmonar e asfixia em decorrência da lesão vascular. Em casos experimentais as mortes foram observadas de oito à quatorze dias após a inoculação do vírus (MACLACHLAN et al., 2008). Dificuldade de deglutição com episódios de regurgitação, bem como secreção nasal mucopurulenta associada a necrose da musculatura do esôfago que resulta em paresia do órgão e consequente pneumonia aspirativa secundária foi descrita em surto no Rio Grande do Sul (ANTONIASSI et al., 2010a). No presente estudo a doença foi observada na forma aguda com morte entre três e oito dias após o início dos sinais clínicos. A suspeita de sequelas com episódios de regurgitação e emagrecimento surgiu entre dois e três meses após o quadro clínico agudo. Nestes casos, a alteração macroscópica foi restrita a dilatação do esôfago observada em dois ovinos. Na microscopia foi observado fibrose do músculo esofágico multifocal e as vezes áreas de proliferação de células adiposas. Estas alterações sugerem ser consequência do vírus da língua azul, pois nesta condição as lesões provocadas na musculatura esofágica podem resultar em dificuldade de deglutição com perda de peso significativa dos ovinos e levar a morte por distúrbios do trato digestivo.

O BTV pode causar alterações sistêmicas como febre, diarreia, hiperemia no períneo além de respiração estertorosa, aumento da frequência cardíaca e morte. Esta enfermidade deve ser diferenciada de outras doenças virais como a febre aftosa, doença hemorrágica epizootica, ectima contagioso e varíola dos ovinos. De acordo com Radostits (2002), essas doenças raramente levam a morte, ao contrário de língua azul.

A investigação epidemiológica é fundamental para concluir o diagnóstico clínico, porém os testes laboratoriais são necessários para confirmação da doença. Imunodifusão em gel de

ágar (IDGA) e teste de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) são os testes laboratoriais mais utilizados no Brasil para confirmação da doença.

O presente estudo demonstrou que o BTV está presente em todas as regiões do estado de SC, no entanto o maior número de resultados positivos foi observado nas regiões 1 e 2 que apresentou temperaturas anuais médias de 18,9°C e 19,9°C respectivamente. As coletas de sangue de ovinos no município de Água Doce, localizado na região 1, apenas 16 de 65 resultaram positivos. Esta diferença, das demais propriedades da região 1 pode ser explicada pela altitude no município (1125 metros), onde a temperatura média (16,7 °C) difere dos demais municípios da mesma região 1, nas quais a temperatura média é de 18,9 graus. Da mesma forma, das amostras coletadas na região 3, nos municípios de Lages, e Correia Pinto apenas quatro ovinos tiveram resultados positivos. Nesta mesma região das amostras coletadas em Bom Retiro, 22 foram positivas e 15 negativas. Este município faz limite com a região 2, portanto, próximo a região com temperaturas mais elevadas. Vale destacar que as amostras de Bom Retiro, foram coletadas durante o mês de abril de 2018, período que coincidiu com a manifestação clínica da doença na propriedade. Acredita-se que a ocorrência da enfermidade neste município foi favorecida pela proximidade com a região 2, de clima mais quente bem como o calor prolongado registrado no ano de 2019 que favoreceu a expansão do mosquito do gênero *Culicoides* sp.. As amostras dos ovinos coletados em São Joaquim, município de baixas temperaturas, resultaram negativas. Regiões de grandes altitudes língua azul normalmente não ocorre (SPREULL, 1905).

A coleta de sangue foi efetuada em ovinos com idades variadas, porém acima dos 6 meses. Nos animais jovens das regiões 1 e 2, a técnica de IDGA, resultou positiva para a maioria dos animais. Na propriedade 22, município de Bom Retiro, dos 37 ovinos coletados 10 eram cordeiros de oito meses, os quais tiveram resultado negativo. Isto pode ser explicado por estes serem mantidos fechados em galpão. Ambientes fechados aparentemente não são habitat favorável ao mosquito *Culicoide* sp. O abrigo dos ovinos pode dificultar a entrada do vetor e evitar a circulação do vírus (SPREULL, 1905).

Os ovinos são mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença clínica quando comparado as demais espécies (bovinos, cabras e camelídeos), porém, em um rebanho ovino pode haver elevado número de animais soropositivos sem desenvolver a doença (KOUMBATI et al., 1999; LIMA et al., 2016; WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008). Isto foi constatado no presente estudo, com ovinos das propriedades 9, 10, 11, 23 e 24 que tiveram positividade para o teste de IDGA, porém em nenhuma delas foi relatado história da doença.

Bovinos são importantes reservatórios da doença, pois passam por um período maior de viremia e raramente desenvolvem sinais clínicos (ALFIERI et al., 2007; BALDINI et al., 2018).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

De acordo com os dados obtidos durante o estudo é possível concluir que o vírus da língua azul está presente no estado de Santa Catarina e que na região Serrana o vírus está se disseminando em decorrência do aumento da temperatura ambiental.

Os casos clínicos crônicos observados causam de perdas econômicas, pois animais com sequelas da doença permanecem nas propriedades com perda de peso progressiva e na maioria dos casos ficam inaptos a reprodução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, A. A. et al. 30 Reoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). . **Virologia Veterinária**. 1^o ed. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 888.
- ANTONIASSI, N. A. B. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul TT - Clinical and pathological changes in sheep naturally infected with bluetongue virus in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1010–1016, 2010a.
- ANTONIASSI, N. A. B. et al. Aspiration pneumonia associated with oesophageal myonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. **Veterinary Record**, v. 166, n. 2, p. 52–53, 2010b.
- BACKX, A. et al. Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. **Veterinary Record**, v. 161, n. 17, p. 591–593, 2007.
- 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, n. 4, p. 567–570, 2014.
- BALDINI, M. H. M. et al. Multiple bluetongue virus serotypes causing death in Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) in Brazil, 2015–2016. **Veterinary Microbiology**, v. 227, n. October, p. 143–147, 2018.
- BATTEN, C. A. et al. Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 1–2, p. 80–88, 2008.
- BIANCHI, R. M. et al. Clinical, pathological and epidemiological aspects of outbreaks of bluetongue disease in sheep in the central region of Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1443–1452, 2017.
- CLAVIJO, A. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **Veterinary Record**, v. 151, n. 10, p. 301–302, 2002.
- DARPEL, K. E. et al. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. **Veterinary Record**, v. 161, n. 8, p. 253–261, 2007.
- FILHO, A. F. B. B. et al. Occurrence and risk factors of the Bluetongue Virus infection in cattle in Pernambuco state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 250–255, 2018.
- GAMBLES, R. M. Bluetongue of Sheep in Cyprus. **Journal of Comparative Pathology and**

Therapeutics, v. 59, p. 176–190, 1949.

GEORGE, T. D. ST. et al. The isolation of a bluetongue virus from Cullcoldes collected in the. **Australian Vererinary Journal**, v. 54, n. October 1977, p. 1977–1978, 1978.

GROOCKOCK, C. M.; CAMPBELL, C. H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 2, p. 160–164, 1982.

GUIMARÃES, L. L. B. et al. Identification of bluetongue virus serotypes 1, 4, and 17 co-infections in sheep flocks during outbreaks in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 113, n. October, p. 87–93, 2017.

HATELEY, G. Bluetongue in northern Europe: The story so far. **In Practice**, v. 31, n. 5, p. 202–209, 2009.

HOLZHAUER, M.; VOS, J. ‘Blue eyes’ in newborn calves associated with bluetongue infection. v. 1, 2009.

HUTCHEON, D. The Malarial Catarrhal Fever of Sheep in South Africa. **The Veterinary Journal and Annals of Comparative Pathology**, v. 37, n. 11, p. 330–334, 1893.

JENCKEL, M. et al. Complete Coding Genome Sequence of Putative Novel Bluetongue Virus Serotype 27. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 16–17, 2015.

KAWANAMI, A. E. et al. Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 137–142, 2018.

KOUMBATI, M. et al. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 277–285, 1999.

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. August, p. 1–5, 2016.

MACLACHLAN, N. J. et al. Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 3, p. 310–315, 2008.

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

MCKERCHER, D. et al. A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 122, n. 913, p. 300–301, 1953.

NIANZU, Z. et al. **Bluetongue History, Serology and Virus Isolations in China**, 1995. (Nota técnica).

OIE. **Bluetongue Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References**.

[s.l: s.n.]. Disponível em:

<https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BLUETONGUE.pdf>.

RADOSTITS, O. M. et al. (EDS.). Doenças causadas por vírus e Chlamydia - I. In: **Clínica Veterinária Um tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara KooGan S.A., 2002. p. 916–1018.

RIET-CORREA, F. Língua Azul. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.). . **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3º ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 169–173.

ROY, P. **Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis**. First ed. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

ROY, P.; BOYCE, M.; NOAD, R. Prospects for improved bluetongue vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 120–128, 2009.

SIB. **Swiss Institute of Bioinformatics**. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/106?outline=all_by_protein>.

SILVA, F. J. F. **Estudos de ocorrência da língua azul em São Paulo**. Comissão de Estudos do Ministério da Agricultura. **Anais...**1978

SPREULL, J. Malarial Catarrhal Fever (Bluetongue) of Sheep in South Africa. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 18, p. 321–337, 1905.

SREENIVASULU, D.; RAO, SUBBA, M. V.; GARD, G. P. **Bluetongue viroses in India: a Review**, 1995. (Nota técnica).

STAIR, E. L.; ROBINSON, R. M.; JONES, L. P. Spontaneous Bluetongue in Texas White-Tailed Deer. **Veterinary Pathology**, v. 5, n. 2, p. 164–173, 1968.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2º ed. São Paulo: Roca, 2004.

WALTON, T. E. The history of bluetongue and a current global overview. **Veterinaria Italiana**, v. 40, n. 3, p. 31–38, 2004.

WILLIAMSON, S.; WOODGER, N.; DARPEL, K. Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. **In Practice**, v. 30, n. 5, p. 242–251, 2008.

ZACHARY, J. F. Mecanismos das Infecções Microbianas. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Eds.). . **Bases da Patologia em Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 147–241.

APÊNDICE – Certificado Comissão de Ética no uso de animais



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo retrospectivo e prevalência do Vírus da Língua azul em ovinos no estado de Santa Catarina", protocolada sob o CEUA nº 50997130319 (m-m-m-m), sob a responsabilidade de **Aldo Gava** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 12/04/2019.

We certify that the proposal "Retrospective study and prevalence of Bluetongue virus in sheep in the state of Santa Catarina", utilizing 384 Ovines (males and females), protocol number CEUA 5097130319 (00000000), under the responsibility of **Aldo Gava** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UNESC) in the meeting of 04/22/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 02/2020

Área: Medicina Veterinária

Origem: Animais de proprietários

Espécie: **Ovinos**

Gêneros: **Machos e Filmeas**

- 6 a 98 meses

NL 384

Linha-gente: não se aplica

Peso: 20 a 200 kg

Local do experimento: O local das coletas serão estabelecidos de forma aleatória e conforme a colaboração dos médicos veterinários e proprietários em diferentes municípios do estado.

Lages, 09 de maio de 2019.

Wpactzenre

Marcia Regina Pflutzerser
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ulirajara Maciel da Costa
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina