



JAIRO NEVES DOS REIS

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA
LÍNGUA AZUL EM VACAS LEITEIRAS EM MINAS
GERAIS, BRASIL**

LAVRAS – MG

2018

JAIRO NEVES DOS REIS

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM
VACAS LEITEIRAS EM MINAS GERAIS, BRASIL**

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

Orientador

Dr. Djeison Lutier Raymundo

Coorientadora

Dra. Ana Paula Peconick

Dra. Mary Suzan Varaschin

LAVRAS - MG

2018

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

Reis, Jairo Neves dos.

Ocorrência de anticorpos contra o vírus da língua azul em
vacas leiteiras em Minas Gerais, Brasil. / Jairo Neves dos Reis. -
2018.

37 p.

Orientador(a): Djeison Lutier Raymundo.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick, Mary Suzan Varaschin.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Vírus da Língua Azul. 2. prevalência. 3. IDGA. I. Raymundo,
Djeison Lutier. II. Peconick, Ana Paula. III. Varaschin, Mary Suzan.
IV. Título.

JAIRO NEVES DOS REIS

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM
VACAS LEITEIRAS EM MINAS GERAIS, BRASIL**

**OCCURRENCE OF ANTIBODIES AGAINST THE BLUE TONGUE VIRUS OF
DAIRY CATTLE IN MINAS GERAIS, BRAZIL**

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

APROVADA EM 19 de junho de 2018

Prof.Dr. Flademir Wouters- DMV/UFLA

Prof. Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães Rocha- DMV/UFLA

Dra. Ana Carolina Diniz Matos - UFMG

Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

Dra. Ana Paula Peconick

Dra. Mary Suzan Varaschin

Coorientadora

LAVRAS - MG

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente, iluminando e guiando todos os dias da minha vida.

As meus pais, Mariana e Joaquim(in memoriam) e aos meus irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram esta caminhada até aqui.

A Ana Paula e meu filho Miguel que sempre me cobriram de amor e carinho, sou imensamente grato por ter vocês ao meu lado.

Ao meu orientador Djeison, sempre paciente, amigo, preocupado comigo, ensinando e apoiando todo este projeto.

A professora Elaine pelo apoio e conselhos no decorrer deste projeto. Meu muito obrigado.Ao pós doutorando Jonata, pela dedicação e ajuda.

Aos colegas Valério, Lucas e Adilson que não mediram esforços para as coletas de materiais, apoio fundamental para a realização deste trabalho.Meu muito obrigado pela parceria.

Agradeço ao apoio e parceria com a professora Zélia Lobato do Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG e principalmente as profissionais do laboratório , Grazi e Carol agradeço a atenção e ajuda enquanto estive lá.

Aos alunos do laboratório de patologia veterinária da UFLA, Vanessa, Paula e Flávio sempre cheios de energia e disposição.

Ao amigo Juninho pelo apoio e contribuição valiosa.

Finalmente, agradeço a todos os meus familiares, amigos, colegas e professores que contribuíram de forma direta ou indireta para o resultado final deste projeto.

Muito Obrigado.

RESUMO

A bovinocultura é de grande importância para o agronegócio brasileiro. O estado de Minas Gerais se destaca como maior produtor de leite do Brasil, representando 26,1% da produção. A Língua Azul é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete ruminantes domésticos e silvestres (MACLACHLAN et al., 2009). As principais consequências econômicas da infecção pelo VLA são perdas diretas devido ao aborto, queda do desempenho reprodutivo e na produção de leite, e perda de condição corporal, e indiretas da restrição internacional de movimentação animal e seus germoplasmas. No Brasil, a enfermidade requer notificação imediata de qualquer caso suspeito (MAPA, 2013). Os bovinos são importantes epidemiologicamente, pois servem como reservatórios do vírus por períodos prolongados (MACLACHLAN et al., 2009). A ocorrência dessa doença está relacionada à presença de vetores transmissores, causada por um orbivírus, transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*, que infecta ruminantes domésticos e selvagens (LOBATO, 1999). O presente trabalho é o primeiro estudo da ocorrência de anticorpos contra o vírus da Língua Azul em bovinos de leite em Lavras e região. Foram coletadas 586 amostras de soro de bovinos fêmeas em idade reprodutiva. As amostras foram testadas com a prova de imunodifusão em gel de agar (IDGA) para pesquisa de anticorpos anti-VLA. Observou-se prevalência de 83,28% em animais foram soropositivos para o Vírus da Língua Azul. Além disso, 100% das propriedades possuíam pelo menos um animal positivo para a doença. Concluindo-se, uma alta prevalência dos animais soropositivos nas propriedades e isto significa que o VLA circula na região avaliada.

Palavras-chave: Vírus da Língua Azul, prevalência, IDGA, Minas Gerais

ABSTRACT

Bovine farming is of great importance for Brazilian agribusiness. The state of Minas Gerais stands out as the largest milk producer in Brazil, accounting for 26.1% of production. The Blue tongue virus (VLA), known worldwide as Bluetongue (BT), is an infectious, non-contagious disease that affects domestic and wild ruminants (MACLACHLAN et al., 2009). The main economic consequences of VLA infection are indirect losses due to abortion, decreased reproductive performance and milk production, and loss of body condition, as well as the international restriction of animal movement and its germplasm. In Brazil, the disease requires immediate notification of any suspected cases (Ministry of Agriculture, 2013). In this context, cattle are important epidemiologically, since they serve as reservoirs of the virus for prolonged periods (MACLACHLAN et al., 2009). The occurrence of this disease is related to the presence of transmitting vectors, caused by an orbivirus, transmitted by *Culicoides* mosquitoes, which infects domestic and wild ruminants (LOBATO, 1999). The present work is the first study of the occurrence of Blue Language in milk cattle in Lavras and region. A total of 586 serum samples were collected from female bovines of reproductive age. Samples were tested with the agarose gel immunodiffusion (IDGA) test for anti-VLA antibodies. A prevalence of 83.28% was observed in animals that were seropositive for Blue-tongue Virus. In addition, 100% of the properties possessed at least one positive animal for the disease. In conclusion, a high prevalence of the animals in the properties and this means that the VLA circulates in the evaluated region.

Keywords: Bluetongue Virus, prevalence, AGID ,Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Primeira Parte

Figura 1 - Período de incubação, pico febril e viremia no sangue de ovinos e bovinos após o repasto sanguíneo de mosquito infectado pelo Vírus da Língua Azul (VLA).....14

Figura 2 - Ciclo epidemiológico do VLA, adaptado de Wilson et AL. (2008).....16

Segunda Parte

Figura 1 - Distribuição de propriedades de bovinos leiteiros pesquisadas para a ocorrência do Vírus da Língua Azul em Lavras e região, Minas Gerais, no ano de 2018.....35

Figura 2 - Percentagens de soropositividade para Língua Azul nas fazendas pesquisadas para a ocorrência do Vírus da Língua Azul em Lavras e região, Minas Gerais, no ano de 2018.....36

LISTA DE TABELAS

Primeira Parte

Tabela 1. Soroprevalência do BTV em ovinos e bovinos no Brasil em diferentes estados realizados pela técnica de IDGA e Elisa nos períodos de 1988 e 2015.....	12
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Métodos laboratoriais de diagnóstico de Língua azul disponíveis para mamíferos terrestres e suas aplicações	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcM- Anticorpo monoclonal

ELISA C- Ensaio de imunoabsorção enzimática competitivo

IDGA- Imunodifusão em gel de ágar

IV - Isolamento viral

LA- Língua Azul

OIE – Organização Mundial de Sanidade Animal

PBMC- Células mononucleares de sangue periférico

RT- PCR- Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

VLA -Vírus Língua Azul

VN -Vírus-neutralização

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	10
1. JUSTIFICATIVA	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO DA DOENÇA DA LÍNGUA AZUL.....	10
2.1 HISTÓRICO	10
2.2 LÍNGUA AZUL NO BRASIL	11
2.3 ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA.....	12
2.4 HOSPEDEIROS E CICLO DA DOENÇA	13
2.5 VIAS DE TRANSMISSÃO, VETOR E SENSIBILIDADE VIRAL	14
2.6 SINAIS CLÍNICOS	16
2.7 DIAGNÓSTICO	17
2.7.1 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR (IDGA).....	18
2.8 TRATAMENTO E CONTROLE	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
4. REFERENCIAS.....	20
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	26
ARTIGO 1 Ocorrência de anticorpos contra o vírus da Língua Azul e caracterização das fazendas de bovinos leiteiros na região de Lavras.	26
ANEXO 1- Modelo de questionário epidemiológico	37

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A Língua Azul (VLA) é uma doença que pode causar aborto e queda do desempenho reprodutivo em vacas, perda de condição corporal e redução na produção de leite. A doença é causada por um orbivírus, e sua ocorrência está relacionada a presença de insetos vetores, do gênero *Culicoides*. A doença está relacionada à presença de vetores transmissores, causada, transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*, que infecta ruminantes domésticos e selvagens (LOBATO, 1999). O vírus da língua azul pode apresentar manifestações com maior gravidade em certas raças de ovinos e em alguns cervídeos, mas raramente causa doença em bovinos. A taxa de mortalidade e a severidade dos sinais clínicos são influenciadas por espécie, raça, idade, status imunológico, sorotipo, amostra do VLA e por interações dos animais com o meio ambiente (TOMICICH, 2006). A grande importância de se determinar os animais portadores é o fato dos bovinos, quando infectados, apresentarem um período de viremia em torno de 100 dias, atuando assim como reservatórios, a partir do qual, os vetores podem se contaminar e transmitir o vírus a outros ruminantes como os ovinos (LAGER, 2004).

2. REFERENCIAL TEÓRICO SOBRE DOENÇA DA LÍNGUA AZUL

2.1 HISTÓRICO

Desde o início do século XIX, na África do Sul, a doença Língua Azul (LA) foi inicialmente denominada doença catarral ovina, recebendo mais tarde o nome de Blue Tongue, devido ao fato das ovelhas apresentarem a língua cianótica como característica da doença. Inicialmente, a abrangência do VLA era restrita aos países da África. Em 1943 ocorreu um surto na ilha de Chipre, e outros surtos subsequentes aconteceram em Israel (1949), Paquistão (1959), Índia (1963), os primeiros surtos na Europa (1956) iniciaram em Portugal e Espanha, matando 179.000 ovinos ao todo na Europa (ACEVEDO et al., 2016). Relatos indicam o aparecimento da doença nas Américas, em 1948 houve as primeiras

evidências da doença nos Estados Unidos, no Peru em 1962 e no Brasil em 1978. Também foi relatado evidências de VLA na Ásia e Oceania (ABREU, 1982).

Sendo considerada uma doença emergente que poderia afetar os rebanhos, por esta razão foi atribuído como doença de lista da OIE (OIE, 2017).

2.2 LÍNGUA AZUL NO BRASIL

O Brasil, Argentina, Guiana Francesa e Equador são os países da América do Sul onde o VLA foi isolado (LEGISA et al., 2013; VIAROUGE et al., 2014; VERDEZOTO et al., 2017). O primeiro caso de isolamento do VLA (sorotipo 4) foi em bovinos zebuínos, na Flórida (EUA), importados do Brasil em 1980 (GROOCOOCK; CAMPBELL, 1982). Posteriormente, em 2001, o sorotipo 12 foi isolado a partir do surto em ovinos e caprinos no Paraná (CLAVIJO et al., 2002). Em 2009, o Rio Grande do Sul relatou um surto em ovinos, com isolamento do sorotipo 12 (ANTONIASSI et al., 2010). Em 2013, o sorotipo 4 foi isolado de um surto em ovinos no Rio de Janeiro (BALARO et al., 2014). Em 2014, o sorotipo 1, 4 e 17 foram identificados a partir de um surto de ovinos no Rio Grande do Sul (GUIMARÃES et al., 2017) e 2015 em um rebanho de ovinos na região sul do estado de Minas Gerais, com o sorotipo 4 (LIMA et al. 2016). Assim, verifica-se a endemicidade para o VLA em grande parte do território brasileiro (LAGER et al., 2004; SCOLARI et al., 2011).

Por fim, em 2015 e 2016, os sorotipos 3, 14, 18, 19 e 22 foram isolados em mortes de veados bororós no Paraná (OIE, 2016). Além disso, diversos inquéritos sorológicos vêm demonstrando a disseminação do VLA no país. Em levantamentos sorológicos, conforme a Tabela 1 de diferentes estados do Brasil percebe-se que a doença está amplamente distribuída

Tabela 1. Soroprevalência do BTV em ovinos e bovinos no Brasil em diferentes estados realizados pela técnica de IDGA e Elisa no período de 1988 a 2015.

Autor	Ano	Estado	Reagentes	Espécie	Teste
Cunha et al	1988	Rio de Janeiro	24,4%	Ovinos	IDGA
Arita et al.	1992	São Paulo	52,7%	Ovinos	IDGA
Pandolfi	1999	São Paulo	87%	Ovinos	ELISA c
Costa et al	2000	Rio Grande do Sul	0,15%	Ovinos	IDGA
Costa et al	2000	Rio Grande do Sul	1,6%	Bovinos	IDGA
Melo et al.	2000	Paraíba	4,38%	Bovinos	IDGA
Lobato et al.	2001	Minas Gerais	61,8%	Ovinos	IDGA
Frota et al.	2001	Ceará	13,61%	Ovinos	IDGA
Leander et al	2002	Minas Gerais	58,6%	Ovinos	IDGA
Konrad et al	2003	Minas Gerais	59,51%	Bovinos	IDGA
Costa et al	2006	Rio Grande do Sul	0,15%	Ovinos	IDGA
Costa et al.	2006	Rio Grande do Sul	0,6%	Bovinos	IDGA
Nogueira et al.	2009	São Paulo	65%	Bovinos	IDGA
Tomich et al.	2009	Mato Grosso do Sul	42,0%	Bovinos	IDGA
Venditi	2009	São Paulo	74,6%	Bovinos	IDGA
Tomich et al.	2009	Mato Grosso do Sul	10,9%	Ovinos	IDGA
Bernardes	2011	São Paulo	42,3%	Bovinos	VN
Negri Filho	2015	Paraná	32,86%	Bovinos	IDGA
Negri Filho	2015	Paraná	100%	Bovinos	Elisa c

2.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A língua azul é uma enfermidade viral infecciosa dos ruminantes e camelídeos, cujos vetores são dípteros hematófagos do gênero *Culicoides*. O vírus da língua azul (VLA) é classificado dentro da família Reoviridae e pertence ao gênero *Orbivirus*, cujas características mais relevantes é o RNA segmentado, simetria icosaédrica, não envelopado e com replicação no citoplasma. Dentro do sorogrupo do VLA, existem pelo menos 27 sorotipos no mundo (MAAN et al., 2012; ZIENTARA et al., 2014).

Os vírions do BTV medem cerca de 65 a 75 nm, o genoma é formado por 10 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) que codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e quatro proteínas não estruturais (NS1 a NS4) (MOHL; ROY, 2014). A VP7 é considerada a principal determinante do sorotipo. Mesmo fazendo parte da estrutura do núcleo sabe-se que ela está exposta em partes da superfície dos vírions, sendo assim capaz de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (NOAD; ROY, 2009). A VP3 está associada com a integridade estrutural do núcleo viral, sendo altamente conservada entre os diferentes sorotipos do vírus (MERTENS et al., 2004).

A VP5 é associada com a penetração do vírion na membrana do endossomo ao induzir instabilidade e permeabilidade de membranas, sendo responsável pela liberação do núcleo viral no citoplasma celular. A proteína VP2, integrante do capsídeo, apresenta atividades de

hemaglutinação, hemadsorção e estimula a produção de anticorpos neutralizantes, sendo extremamente variável entre os sorotipos do BTV (NOAD; ROY, 2009). Acredita-se que a proteína VP1 seja a RNA polimerase viral responsável pela transcrição e pela replicação do genoma durante a replicação viral nas células do hospedeiro, fazendo parte do complexo de transcriptase junto às proteínas VP4 e VP6 (PATEL; ROY, 2014). As proteínas não estruturais NS1, NS2, NS3 e NS4 são produzidas durante a replicação, e estão envolvidas nos processos de replicação, maturação e saída dos vírions das células infectadas do hospedeiro. Os genes que codificam essas proteínas são altamente conservados entre os diferentes sorotipos do BTV, demonstrando sua importância no processo de replicação do vírus (RATINIER et al., 2011).

As manifestações da doença vão desde inaparente até fatal, dependendo do sorotipo viral envolvido, da espécie, da raça e da idade do animal infectado (ELBERS et al., 2008; BALARO et al., 2014). A língua azul normalmente ocorre quando espécies sensíveis são introduzidas em áreas com circulação de cepas virulentas ou quando estirpes virulentas de língua azul são introduzidas nas populações de ruminantes não expostas previamente (ZIENTARA et al., 2013).

As perdas mundiais econômicas devido à língua azul não foram expressas em números exatos, mas a estimativa é de três bilhões de dólares por ano nos EUA. As perdas são tanto diretas (óbitos, abortamento, perda de peso, produção de leite reduzida e queda na eficiência da produção de carne) quanto indiretas, como resultado das restrições à exportação de animais vivos, sêmen e alguns produtos como o soro fetal bovino (TABACHNICK, 1996).

2.4 HOSPEDEIROS E CICLO DA DOENÇA

A língua azul afeta ruminante domésticos e silvestres. Os ovinos são os mais suscetíveis de desenvolver o quadro clínico, quando comparado aos outros ruminantes (bovinos, caprinos e cervos). Em bovinos, os quais desempenham um papel importante na epidemiologia do vírus, principalmente por causa da viremia prolongada, a doença tem, na sua maioria, sido relatada por ter um curso inaparente (TWEEDLE; MELLOR, 2002). Geralmente a doença ocorre na primavera e início do verão (época das chuvas) em bovinos e ruminantes selvagens. Nesta época, ocorre aumento da população de vetores com conseqüente amplificação do vírus. No final do verão e início do outono, o vírus chega aos ovinos, provocando a infecção e apresentação clínica da doença. Após a infecção, o período de incubação ocorre em torno de sete dias, podendo variar de dois a 15 dias. Nos ovinos, de três

a seis dias após a infecção, o vírus aparece no sangue com uma concentração máxima de sete a oito dias (culmina com pico febril) (Figura 1).

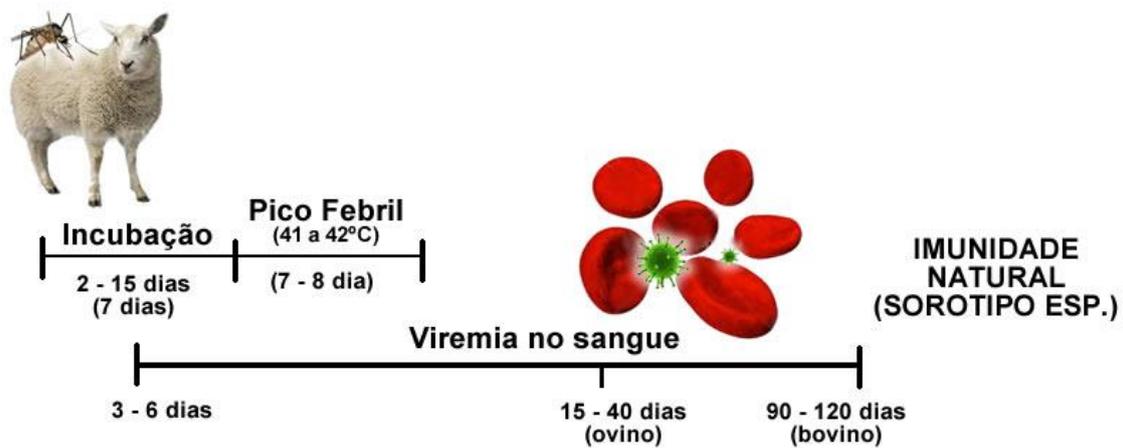


Figura 1 - Período de incubação, pico febril e viremia no sangue de ovinos e bovinos após o repasto sanguíneo de mosquito infectado pelo Vírus da Língua Azul (VLA). (BALARO et al.,2017)

A viremia no ovino raramente persiste por mais de 14 dias, mas pode chegar até 40 dias. Devido a diferenças na resposta imune e interações do vírus com a superfície da hemácia, os bovinos (adultos e bezerras) estendem um quadro de viremia por até 90 - 120 dias e são considerados os mais importantes reservatórios mamíferos da doença. No sangue, o vírus é encontrado associado com a hemácia e uma pequena parte livre no plasma. Entretanto, o ácido nucléico do VLA pode ser detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue de vacas e ovelhas infectadas por muitos meses mas, não se pode fazer o isolamento viral em cultura de células ou inoculação em ovelha.suscetíveis.(MACLACHLAN, 2004). Após a doença natural, o animal mantém a imunidade contra o sorotipo específico e pode adoecer por outro sorotipo (VERWOERD; ERASMUS, 2004; COETZEE et al., 2012).

2.5 VIAS DE TRANSMISSÃO, VETOR E SENSIBILIDADE VIRAL

A doença não é contagiosa e poucos vírus são encontrados em secreções e excreções de animais infectados, como cavidade oral, aerossóis, tecidos de órgãos, carcaças e produtos (leite, carne e lã) (VERWOERD; ERASMUS,2004). A principal forma de transmissão da doença entre os animais ocorre por meio do repasto sanguíneo de dípteros do gênero *Culicoides* também conhecido como maruim, borrachudo ou mosquito-pólvora (Figura 2).

Os pequenos dípteros hematófagos, medem cerca de 3mm, se reproduzem em diversos locais de umidade elevada, incluindo buracos de árvores, vegetação em decomposição, margens de lago, solos úmidos e certos tipos de esterco herbívoro (CHAGAS et al, 2004). Após a inoculação do vírus através da picada do vetor o vírus migra para o linfonodo regional (MACLACHLAN, 2004). O vírus é levado através dos vasos linfáticos para todo o corpo do animal. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) representam a população de células alvo capaz de transportar o vírus aos locais secundários de replicação (WHETTER *et al.*, 1989; BARRATT-BOYES *et al.*, 1992). A multiplicação do VLA ocorre principalmente em fagócitos mononucleares e células endoteliais e este evento é seguido por uma liberação abundante de vírus para a corrente sanguínea (MACLACHLAN *et al.*, 1990; BARRATT-BOYES; MACLACHLAN, 1994). A transmissão intrauterina foi comprovada na literatura em bovinos, caprinos e ovinos (DESMECHT et al., 2008; WORWA et al., 2009; SAEGERMAN et al., 2011; ZANELLA et al., 2012; COETZEE et al., 2013). Os vírus também foram isolados de amostras de sêmen bovino coletadas em 2011 em Minas Gerais, Brasil, continha VLA-4, VLA-8, VLA-10 e VLA-16. (GASPARINI et al 2017) No âmbito reprodutivo, o sêmen fresco ou congelado possui potencial para infecção, mas não apresenta grande importância na transmissão (KIRKLAND et al., 2004; NAPPA et al., 2011, GASPARINI et al 2017). Atualmente, apenas os mosquitos do gênero *Culicoides* possuem importância como vetores da doença, e sobrevivem por cerca de dez a 90 dias sem evidência de transmissão transovariana. O vírus possui sensibilidade a pHs extremos (instável abaixo de 6,5) e altas temperaturas. São resistentes a solventes lipídicos (orgânicos) como clorofórmio e éter, mas são inativados por desinfetantes contendo substâncias ácidas, alcalinas, hipoclorito de sódio, álcoois, glutaraldeídos e iodóforos. Também são sensíveis à congelação lenta entre -10 °C e -20 °C, por isso é desaconselhável a emissão de amostras congeladas para o laboratório (OIE, 2008).

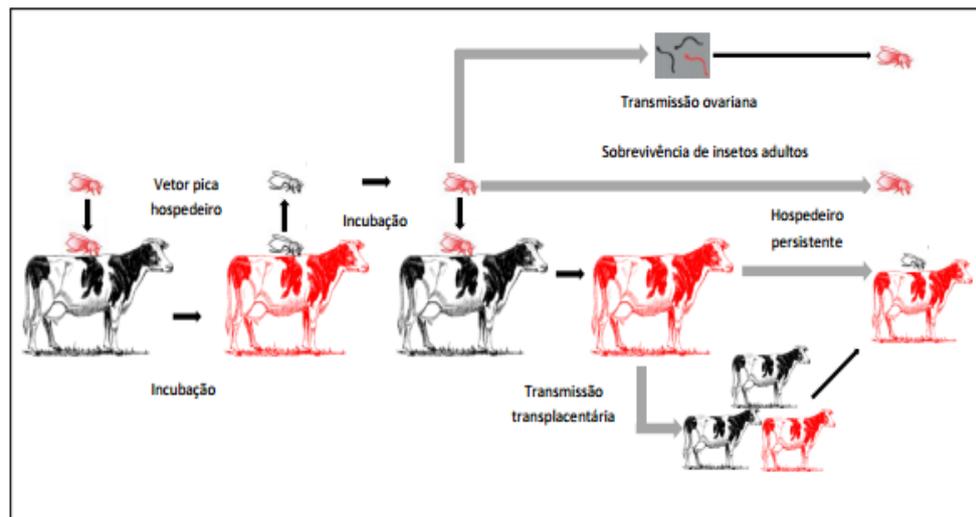


Figura 2- Ciclo epidemiológico do VLA, adptado de Wilson et AL. (2008)

2.6 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos em bovinos são raros e geralmente estão limitados a uma resposta febril transitória, aumento da frequência respiratória, lacrimejamento e salivação aumentada, rigidez e alterações inflamatórias na pele (VERWOERD; ERASMUS, 2004). Alterações reprodutivas como abortamentos e nascimento de filhotes com hidrocefalia também são relatadas (WILLIAMSON et al., 2010; ZANELLA et al., 2012).

Em bovinos a doença clínica é rara (TWEEDLE; MELLOR, 2002) com exceção da infecção pelo VLA-8 em um surto nos Países Baixos, em 2006, observou-se morbidade de 2,5% ,com mortalidade de 0,22%.Os bovinos infectados dentro dos rebanhos manifestaram sinais clínicos pequenos ou inaparentes em sua maioria (ELBERS et al., 2008). Os estágios iniciais são caracterizados por apatia, febre e depressão seguida de erosão e necrose da mucosa oral e nasal, corrimento nasal, salivação excessiva, claudicação, conjuntivite, dermatite ulcerativa, diarréia ocasional sanguinolenta, edema e hiperemia. A pele dos tetos muitas vezes está inflamada e pode rachar e descascar (TWEEDLE; MELLOR, 2002; THIRY et al., 2006; WILLIAMSON et al., 2008; ELBERS et al., 2008). Ordenhar vacas com essas lesões pode acarretar em perda da produção leiteira (THIRY et al., 2006; MEHLHORN et al., 2008; ELBERS et al., 2009). A infecção da vaca em estágios iniciais de gestação pode resultar em morte prematura e reabsorção do embrião; outras conseqüências envolvem aborto ou o nascimento de bezerros fracos e com má formação (MACLACHLAN et al., 2000; DESMECHT et al., 2008; SAVINI et al, 2014).

2.7 DIAGNÓSTICO

Testes sorológicos são importantes para conhecer a distribuição da infecção, podendo ser utilizado para confirmar a infecção pelo vírus, porém em áreas endêmicas, são necessários outros testes complementares. Vários testes de diagnóstico são utilizados para avaliar a infecção de ruminantes pelo VLA, incluindo a pesquisa direta do vírus por isolamento viral (IV) e RT-PCR e para pesquisa de anticorpos por vírus-neutralização (VN), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ELISA C e Teste de Fixação de Complemento (CFT) (LOBATO, 1999). Quadro 1.

Quadro 1. Métodos laboratoriais de diagnóstico de Língua azul disponíveis para mamíferos terrestres e suas aplicações.

Método	Objetivo					
	População livre de infecção	Indivíduo livre de infecção antes de transporte	Contribuir para políticas de erradicação	Confirmação de casos clínicos	Prevalência de infecção - vigilância	Imunidade individual ou de populações após vacinação
Identificação do agente						
RT-qPCR	-	+++	-	+++	++	-
RT-PCR	-	+++	-	+++	++	-
Isolamento viral	-	+++	-	+++	-	-
Deteção de resposta imune						
C-ELISA (sorogrupo específico)	++	+++	++	-	++	++
VN (sorotipo específico)	++	+++	++	-	++	++
IDGA	+	-	+	-	+	+
CFT	+	-	+	-	+	+

Fonte: OIE, Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, 2016.

+++ = método recomendado; ++ = método adequado; + = pode ser usado em alguns casos, mas custo, confiabilidade ou outros fatores limitam sua aplicação; - = não apropriado para esse objetivo.

RT-qPCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa; RT-PCR = reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa; C-ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay competitivo; VN = vírus neutralização; IDGA = imunodifusão em gel de ágar, CFT = teste de fixação do complemento.

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

anticorpos contra o BTV em diferentes espécies de ruminantes. É considerado importante ferramenta para a vigilância epidemiológica da doença e para emissão de certificados de trânsito para rebanhos destinados à exportação (LOBATO, 1999; OIE, 2016). Uma alternativa para o diagnóstico é a técnica da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) que detecta a presença do ácido nucléico viral em amostras clínicas (OIE, 2016). A RT-PCR consiste na amplificação de segmentos específicos contidos no genoma do BTV, que podem ainda ser seqüenciados e comparados com seqüência disponíveis em bancos de dados, como GeneBank (ANTONIASSI et al., 2010). O ELISA-C, produzido com anticorpo monoclonal (AcM) sorogrupo específico, foi desenvolvido para evitar reações cruzadas verificadas com o IDGA relacionadas a outros membros do gênero *Orbivirus*. O valor do índice kappa entre os resultados das técnicas de IDGA e cELISA demonstrou uma concordância quase perfeita (THRUSFIELD, 2004) entre as técnicas. Para identificação e isolamento viral no período de viremia, deve-se coletar amostra de sangue total (tubo com EDTA ou heparina). No caso de óbito e realização de necropsia, devem-se coletar fragmentos de baço, pulmão, tonsilas e linfonodos pré-escapular, mesentéricos, poplíteos e ilíacos (OIE, 2008; WORWA et al., 2010).

2.7. 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 *Orbivirus*, como o vírus da doença hemorrágica epizootica dos cervídeos (EHD) e vírus da doença equina africana (COSTA et al., 2006). Para a detecção de anticorpos precipitantes contra o Vírus da Língua Azul, será utilizada a técnica (IDGA), de acordo com Pearson e Jochim (1979). A leitura será realizada através da luz indireta e fundo escuro, observando-se as linhas de precipitação, formadas entre o antígeno e o anticorpo. A identidade da linha formada com o soro controle positivo foi à base para leitura do teste.

2.8 TRATAMENTO E CONTROLE

A língua azul é uma doença de notificação obrigatória para a Organização Mundial para Saúde Animal – OIE, e deve ser realizada em até 24 horas após diagnóstico da doença. O controle deve ser baseado em ações integradas envolvendo o vetor, o hospedeiro e o ambiente. Não existem tratamentos específicos para a língua azul. Em animais doentes, pode ser adotada a antibioticoterapia profilática visando a prevenção de infecções bacterianas secundárias (RADOSTITS et al., 2007). A vacinação contra LA, disponível somente para animais domésticos, é usada em diversos países onde a doença é endêmica, para limitar as perdas diretas, minimizar a circulação do vírus e permitir a movimentação de animais (OIE, 2014). Uma vacina eficiente e segura ainda não está disponível comercialmente. Vacinas com eficácia variável têm sido desenvolvidas, incluindo vacinas atenuadas, inativadas e com base em DNA recombinante. Atualmente apenas vacinas com vírus atenuado estão disponíveis comercialmente (LOBATO, 1999; RADOSTITIS et al., 2002; BREARD et al., 2004). Dentre as desvantagens do uso de vacinas com vírus vivo atenuado, pode-se citar: desenvolvimento da doença em algumas raças de ovelhas susceptíveis, os sorotipos podem ser transmitidos pelos vetores *Culicoides* e podem ocorrer rearranjos entre o vírus da vacina e os sorotipos presentes no campo (MELLOR et al., 2009). As vacinas inativadas não estavam disponíveis comercialmente na Europa e foram exclusivamente usadas durante o surto que ocorreu na Europa do sorotipo 8 de LA. No Brasil, a vacinação não é liberada, e mais estudos são necessários para conhecer sobre a doença e os sorotipos presentes no país (CLAVIJO et al., 2002). O controle da população de insetos vetores é outra opção de prevenção e controle e pode ser feita pela ação de inseticidas. Estes podem ser aplicados sobre os hospedeiros, ambiente aéreo e aquático, além da eliminação dos sítios de reprodução dos insetos, tais como áreas pantanosas e acúmulos de água. No entanto, muitas vezes todas estas medidas têm se mostrado ineficientes, além de provocar problemas ambientais (contaminação) e gastos financeiros (LOBATO, 1999). O tratamento de bovinos com anti-helmínticos como as ivermectinas, tem efeito larvicida para os *Culicoides* que se reproduzem em esterco de animais (LOBATO, 1999). Abrigar o rebanho em período de atividade dos vetores, período crepuscular e noturno, ou impedir seu acesso às áreas alagadiças pode diminuir o risco de contato entre hospedeiro e vetor (BREARD et al., 2004).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é o primeiro estudo da ocorrência de Língua Azul em bovinos de leite em Lavras e região, além da caracterização das fazendas que participaram do projeto. Assim, podemos concluir, que o Vírus da Língua Azul circula nos rebanhos bovinos da região, todas as propriedades estudadas apresentaram pelo menos um animal positivo para anticorpos contra o BTV, sendo que algumas propriedades observamos 100% dos animais coletados positivos. Os animais positivos, na técnica de diagnóstico sorológico, não apresentavam qualquer tipo de sinal clínico no momento das coletas. Os resultados salientam a necessidade de aperfeiçoamento da vigilância da infecção por VLA no Brasil, principalmente com mais trabalhos para conhecermos melhor a sua distribuição e sua epidemiologia .

4. REFERENCIAS

ABREU, V. L. V; Prevalência de Bovídeos Reagentes à prova de imunodifusão para língua azul na região norte do Brasil. Tese de dissertação de Mestrado em medicina veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

ACEVEDO, A. M.; HINOJOSA, Y.; RELOVA, D. Bluetongue virus: a known virus, a current threat. **Revista. Salud Animal.** v. 38, n. 1, p. 52-59, 2016.

ALFIERI, A. A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed). *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora da UFSM. p. 773-807, 2007.

ANTONIASSI, N. A. B.; PAVARINI, S. P.; RIBEIRO, L. A. O.; SILVA, M. S.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. Alterações Clínicas E Patológicas Em Ovinos Infectados Naturalmente Pelo Vírus Da Língua Azul No Rio Grande Do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,v. 30 (12),p. 1010–1016, 2010.

BALARO, M. F. A.; DOS SANTOS LIMA, M.; DEL FAVA, C.; DE OLIVEIRA, G. R.; PITUCO, E. M.; BRANDÃO, F. Z. Outbreak of Bluetongue Virus Serotype 4 in Dairy Sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**,v. 26 (4),p. 567–570, 2014.

BARRATT-BOYES, S.M.; ROSSITTO, P.V.; STOTT, J.L.; MACLACHLAN, N.J. Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. **Journal of General Virology**, v.73, n.8, p.1953-60, 1992.

BREARD, E.; HAMBLIN, C.; HAMMOUMI, S.; SAILLEAU, C.; DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. **Research in Veterinary Science**, v.77, p.1-8, 2004.

CHAGAS, AC.S., PINHEIRO, R.R. Língua Azul: uma nova doença que pode comprometer o rebanho brasileiro. Disponível em: <http://www.capritec.com.br>

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J. W. Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America. **Veterinary Record**, v. 151 (10),p. 301–302, 2002.

COETZEE P, STOKSTAD M, VENTER EH, MYRMEL M, VAN VUUREN M. Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. **Virol J.**;9:198 2012.

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, 2006.

DESMECHT, D.; VANDEN BERGH, R.; SARTELET, A.; LECLERC, M.; MIGNOT, C.; MISSE, F.; SUDRAUD, C.; BERTHEMIN, S.; JOLLY, S.; MOUSSET, B.; LINDEN, A.; COIGNOUL, F.; CASSART, D. Evidence for transplacental transmission of the current wildtype strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. **Veterinary Record**, v.163, p.50–52, 2008.

ELBERS, A.R.W.; BACKX, A.; MEROCC, E.; GERBIER, G.; STAUBACH, C.; HENDRICKX, G.; VAN DER SPEK, A.; MINTIENS, K. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**,

v.87, p.21–30, 2008.

ELBERS, A.R.W.; VAN DER SPEK, A.N.; VAN RIJN, P.A. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. **Preventive Veterinary Medicine**, v.92, p.1–8, 2009.

GROOCOCK CM, CAMPBELL CH. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Can J Comp Med.**;v.46(2):p.160-4; 1982.

GUIMARÃES L L B, ROSA J C C, MATOS A C D, CRUZ R A S., GUEDES M I M C, DORELLA F A, FIGUEIREDO H C P, PAVARINI S P, SONNE L, LOBATO Z I P, DRIEMEIER D, Identification of bluetongue virus serotypes 1, 4, and 17 co-infections in sheep flocks during outbreaks in Brazil, **Research in Veterinary Science**, p. 87-93,2017.

KIRKLAND PD, MELVILLE LF, HUNT NT, WILLIAMS CF, DAVIS RJ. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. **Vet Ital.** v. 40 (4): p.497-501;2004.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in south America overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v.40, n.3, p.90-93, 2004.

LEGISA D, GONZALEZ F, STEFANO G, PEREDA A, DUS SANTOS MJ. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. **J Gen Virol.**;v.94(3): p.652-62. 2013.

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

LOBATO, Z.I.P. Língua Azul: a doença nos bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23 n. 4 p. 515 – 523, 1999.

MAAN NS, MAAN S, BELAGANAHALLI MN, OSTLUND EN, JOHNSON DJ, NOMIKOU K, et al. Identification and differentiation of the twenty six Bluetongue virus

serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. **PLoS One**.7(2):e32601: 2012.

MACLACHLAN, N.J. Bluetongue: Pathogenesis and duration of viraemia. **Veterinaria Italiana**, 311 v.40, p.462-467, 2004.

MACLACHLAN, N.J.; JAGELS, G.; ROSSITTO, P.V.; MOORE, P.F.; HEIDNER, H.W. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. **Veterinary Pathology**, v.27, p.223-229, 1990.

MATOS ACD, BALARO MFA, GUEDES MIMC, COSTA EA, ROSA JCC, COSTA AG, et al. Epidemiology of bluetongue outbreak in a sheep flock in Brazil. **Vet Ital.** ;v.52(3-4): p. 325-31; 2016.

MEHLHORN, H.; WALLDORF, V.; KLIMPEL, S.; SCHMAHL, G. Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. **Parasitology Research**, v.103, p.79-86 2008.

NAPP S, ALLEPUZA A, GARCÍA-BOCANEGRA I, ALBAA A, VILAR MJ, CASAL J. Quantitative assessment of the probability of bluetongue virus transmission by bovine semen and effectiveness of preventive measures. **Theriogenology**. v.75, p.920-932, 2011.

OIE, 2017. Organização Mundial de Saúde Animal. Disponível em:<<http://www.oie.int>> Aceso em: 12 dez. 2017.

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

RADOSTITS OM, GAY CC, HINCHCLIFF KW, CONSTABLE PD. Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horse, sheep, pigs and goats. 10° ed. **Philadelphia: Saunders Elsevier**;p.1691-1783; 2007.

SAEGERMAN C, BOLKAERT B, BARICALLA C, RAES M, WIGGERS L, LEEUW I, et al. The impact of naturally occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. **Vet J.** ;v.187(1):p.72-80; 2011.

SCOLARI APR, AYUB BR, SOTOMAIOR CS, OLLHOFF RD. O vírus da língua azul em ruminantes domésticos: situação de alerta no Brasil – Revisão. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias Ambientais**; v. 9(4): p.407-13; 2011.

SHRINGI, S.; SHIRINGI, B. N. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies breeds of 43 sheep and goats in Rajasthan, India. **Journal of Veterinary Science**, v.6, n.1, p.77-79, 2005.

TABACHNICK WJ. Culicoides variipennis and bluetonguevirus epidemiology in the United States. **Annu Rev Entomol.**v.41: p. 23-34; 1996.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**; v.37, p.169-190, 2006.

TOMICH, R.G.P.; PELLEGRIN, A.O.; CAMPOS, F.S.; LOBATO, Z.I.P; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Epidemiologia do vírus da língua azul em rebanhos bovinos. Corumbá: Embrapa Pantanal, 26p., 2006.

TWEEDLE N. & MELLOR P.S. Technical review-bluetongue: the virus, hosts and vectors. Version 1.5. **Report to the Department of Health, Social Services and Public Safety UK (DEFRA)**. 25p, 2002.

VERDEZOTO J, BREARD E, VIAROUGE C, QUENAULT H, LUCAS P, SAILLEAU C, et al. Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. **Transbound Emerg Dis.**;p. 1-4. 2017.

VERWOERD DW, ERASMUS BJ. BLUETONGUE. IN: COETZER JAW, TUSTIN RC (Eds). **Infectious Disease of Livestock**. 2º ed. Cape Town: Oxford University Press; p.1201-20; 2004.

VIAROUGE C, LANCELOT R, RIVER G, BRÉARE E, MILLER M, BAUDRIMONY X, et al. Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. **Veterinary Microbiology** ;v.174(1-2):p.78-85; 2014.

WHETTER, L.E.; MACLACHLAN, N.J.; GEBHARD, D.H.; HEIDNER, H.W.; MOORE, P.F. Bluetongue virus infection of bovine monocytes. **Journal of General Virology**, v.70, p.1663– 1676, 1989.

WILLIAMSON SM, SCHOLE SFE, WELCHMAN DB, DENNISON M, BATTEN CA, WILLIAMS DL, et al. Bluetongue virus serotype 8-associated hydranencephaly in two calves in southeastern England. **Veterinary Record**.v.167(6): p.216-8; 2010.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees*, 6th ed.; OIE: Paris, 2008.

WORWA G, HILBE M, CHAIGNAT V, HOFMANN MA, GRIOT C, EHRENSPERGER F, et al. Virological and pathological findings in Bluetongue virus serotype 8 infected sheep. **Veterinary Microbiology** .v.144(3-4):p. 264-73; 2010.

ZANELLA G, DURAND B, SELLAL E, BREARD E, SAILLEAU C, ZIENTARA S, et al. Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008–2009. **Theriogenology**. v. 77(1): p.65-72; 2012.

ZIENTARA S, SAILLEAU C, VIAROUGE C, HÖPER D, BEER M, JENCKEL M, et al. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerging Infectious Diseases* v.20(12): p. 2123-5; 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 Ocorrência de anticorpos contra o vírus da Língua Azul e caracterização das fazendas de bovinos leiteiros na região de Lavras.

Este artigo, foi redigido, de acordo com as normas da Revista
Pesquisa Veterinária Brasileira para submissão.

Jairo N. Reis³, Ana Paula Peconick², Mary S. Varaschin³, Elaine Maria Seles Dorneles², Jonata de Melo Barbieri⁵, Ana Carolina Diniz Matos⁴, Paula Reis Ribeiro³, Vanessa Teixeira D'Paula³, Flavio Henrrique Arantes³, Djeison L. Raymundo³

²Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil.

³Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA),

⁴ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

ABSTRACT.- Reis J.N., Ana Paula Peconick, Mary S. Varaschin, Elaine Maria Seles Dorneles, Jonata de Melo Barbieri, Ana Carolina Diniz Matos, Paula Reis Ribeiro, Vanessa Teixeira D'Paula, Flavio Henrrique Arantes, Raymundo D.L. 2018. **[Occurrence of antibodies against the Blue tongue virus and characterization of dairy cattle farms in the region of Lavras.]** Ocorrência de anticorpos contra o vírus da Língua Azul e caracterização das fazendas de bovinos leiteiros na região de Lavras. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037. Lavras, MG 37200-000, Brasil, E-mail: djeison.raymundo@dmv.ufla.br. The aim of this study was to determinate epidemiological aspects of Blue Tongue Virus (BTV) infection from bovines at Lavras, Minas Gerais state, Brazil. A total of 586 serum samples were collected from female bovine at reproductive age. Samples were tested by immune diffusion agarose gel (IDGA) searching for anti-BTV antibodies. Animals had a prevalence of 83.28% (488/586; 95%CI=80.0-86.21) were positive to Blue Tongue Virus. Furthermore, a total of 100% of properties (54/54; 95%CI=93.4-100) had at least one positive animal and a range of occurrence of 45.45% a 100% into the flock. 22.22% of properties had a 100% of positive animals. This is the first detection record of anti-BTV antibodies at Minas Gerais region.

Keywords: Bluetongue Virus, prevalence, AGID ,Minas Gerais.

RESUMO.- Objetivou-se com este estudo determinar os aspectos epidemiológicos da infecção pelo Vírus da Língua Azul (VLA) em bovinos leiteiros em Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil. Foram coletadas 586 amostras de soro de bovinos fêmeas em idade reprodutiva. As amostras foram testadas com a prova de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) para pesquisa de anticorpos anti-VLA. Observou-se prevalência de 83.28% em animais, (488/586; IC95% = 80.0 - 86.21) foram soropositivos para o Vírus da Língua Azul. Além disso, 100% (54/54; IC95% = 93.4 - 100.0) das propriedades possuíam pelo menos um animal positivo e, com ocorrências que variaram de 45,45% à 100% dentro dos rebanhos, onde 22,22% das propriedades tiveram 100% dos animais coletados positivos. Este é o primeiro registro de detecção de anticorpos anti-VLA em bovinos na Região do Sul de Minas Gerais. Os resultados sugerem, que o VLA está presente nos bovinos na área estudada.

TERMO DE IDEXAÇÃO: Vírus da Língua Azul, prevalência, IDGA, Minas Gerais

INTRODUÇÃO

A língua azul é uma doença de notificação obrigatória listada pela Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (World Organisation for Animal Health, 2016). No Brasil, a enfermidade requer notificação imediata de qualquer caso suspeito (Mapa, 2013). Trata-se de patologia causada por um vírus RNA fita dupla pertencente ao gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*, cujos vetores são artrópodes hematófagos do gênero *Culicoides* (Maclachlan, 2011). Atualmente, pelo menos 27 sorotipos já foram relatados (Jenckel et al., 2015). A infecção pelo vírus da Língua Azul (VLA) ocorre em diferentes espécies de animais, apesar de sinais clínicos significativos ocorrerem principalmente em ovinos. Bovinos e caprinos são os principais reservatórios do vírus. A taxa de mortalidade pode chegara 50-70%, em certas raças ovinas (Mohammadi et al., 2012; Sok et al., 2014). Nos bovinos, até 5% dos animais podem se tornar doentes; contudo, apresentam taxa de mortalidade abaixo de 1%. A taxa de mortalidade e a severidade dos sinais clínicos são influenciadas por espécie, raça, idade, *status* imunológico, sorotipo, amostra do VLA e por interações dos animais com o meio ambiente (Tomich, 2007).

No Brasil, dados sorológicos obtidos pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), sugerem a presença do vírus em diversas regiões (Konrad et al., 2003). Uma soroprevalência de quase 60% para o VLA foi detectada em ovinos estudados no Distrito Federal, sugerindo que a proximidade dos rebanhos bovino e ovino favorece a persistência e propagação de doenças (Dorneles et al., 2012). A doença clínica foi constatada em ovinos nos estados do Paraná (Clavijo et al., 2002), no Rio Grande do Sul (Antoniassi et al., 2010), Rio de Janeiro (Balara et al., 2014), e na região sul do estado de Minas Gerais (Lima et al. 2016).

O impacto econômico da doença está relacionado não somente com óbitos nos rebanhos ovinos, mas também com a possível correlação da infecção pelo vírus com o desenvolvimento de outras doenças, como pneumonia, aborto e problemas locomotores. As restrições ao comércio internacional de animais e seus produtos (World Organisation For Animal Health, 2008), tais como sêmen, embriões, e leite e seus derivados podem causar grandes perdas econômicas para o país, embora nenhuma estimativa precisa tenha ainda sido fornecida (Lobato et al., 2015). Os bovinos são acometidos pelo VLA,

podendo desenvolver sinais clínicos que vão desde perdas reprodutivas, como morte embrionária, aborto, mal formação fetal, esterilidade temporária, infertilidade em touros (Osburn, 1994), natimortos e nascimento de animais fracos (Lobato, 1999). Estes animais desempenham importante papel na epidemiologia da doença por se tornar reservatórios do vírus (Adam et al. 2014, Khair et al. 2014). O Brasil possui condições climáticas que favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores de VLA, facilitando que a doença se dissemine de forma silenciosa. No entanto, pouco se conhece sobre a doença e sorotipos presentes no país, o que dificulta a implementação de medidas seguras para movimentação de animais (Lobão et al., 2014). Desta forma objetivou realizar um estudo da soropositividade da Língua Azul, em Minas Gerais, na região de Lavras e cidades circunvizinhas onde se concentra uma grande bacia leiteira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

As amostras foram transportadas e armazenadas no Setor de Patologia Veterinária, na Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA) onde foram centrifugadas por 3 minutos a 3.000 rotações e as alíquotas do soro obtidas, transferidas para microtubos e mantidas a -20 °C até a realização dos A execução do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras, sob protocolo número 017/15.

Foi realizado um estudo transversal para avaliação da frequência de bovinos e rebanhos soropositivos para língua azul na região do Sul de Minas Gerais. Neste estudo, foram visitadas 54 propriedades criadoras de gado leiteiro, sendo as propriedades estudadas localizadas nas cidades de: Itumirim (11), Bom Sucesso (9), Ijací (7), Lavras (6), Nazareno (5), Ingaí (3), Conceição da Barra de Minas (3), Ibituruna (2), São Tiago (1), Ribeirão Vermelho (1), Oliveira (1), Ritópolis (1), Luminárias (1), Boa Esperança (1), Santo Antônio do Amparo (1) e São Sebastião da Vitória (1), durante o período de julho de 2017 a outubro de 2017.

A amostragem realizada foi não probabilística por conveniência, em propriedades em um raio de até 120 Km da cidade de Lavras, todas as propriedades com assistência técnica especializada onde foram coletadas amostras de soro de vacas em lactação, acima de 24 meses de idade, por punção da veia jugular e ou veia coccídea. A amostragem intra-rebanho foi definida a fim de se obter uma sensibilidade e especificidade de rebanho acima de 90% para a doença testada, os parâmetros de 95% de sensibilidade e 99% de especificidade. Com base nestes cálculos, foram amostrados 11 animais aleatoriamente, em cada propriedade visitada, totalizando 586 amostras para execução deste projeto. Animais em período de transição gestacional, animais com 30 dias antes do parto e 30 dias após o parto, não foram coletados, pois existe uma mudança no perfil imunológico nesta fase da vida (Kjersti et al, 2006).

Na ocasião da coleta foi aplicado em cada propriedade, um entrevista, com perguntas abrangendo a coleta de dados associados às características de produção e práticas sanitárias das propriedades amostradas (Anexo 1).

Análise Sorológica

Para a detecção de anticorpos precipitantes contra o Vírus da Língua Azul (VLA), foi utilizada a técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), de acordo com Pearson e Jochim (1979). Este teste foi realizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi utilizada solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% e agarose na concentração final de 0,9% em água destilada deionizada, que foi depositada sobre

placas de petri. O antígeno foi colocado no centro e o soro controle positivo em outros três poços na quantidade de 25 µL em cada poço, nos poços restantes foram colocados as amostras a serem testadas. As placas de petri permaneceram em câmara úmida com sulfato de cobre 0,5% por 48 horas em temperatura ambiente.

A leitura do IDGA foi realizada através da luz indireta e fundo escuro, observando-se as linhas de precipitação, formadas entre o antígeno e o anticorpo. A identidade da linha formada com o soro controle positivo foi à base para leitura do teste. O antígeno foi produzido pela Escola de Veterinária da UFMG utilizando o VLA 4 e o soro controle positivo proveniente de soro de bovinos positivos previamente testados e titulados pela Escola de Veterinária da UFMG.

Análise de Dados

Foi feita análises descritivas, das propriedades e a distribuição de frequência entre propriedades com intervalo de confiança de 95% das variáveis da entrevista. Foi utilizado o software R (R version 3.1.1, R Development Core Team, New Zealand), com a utilização dos pacotes Dplyr, knitr, kableExtra e binGroup.

Foram marcadas as coordenadas das fazendas, a fim de obter-se o georreferenciamento de cada uma das propriedades pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS), conforme (Figura1). Para mapeamento e identificação dos pontos espaciais, os dados foram lançados no Software GPS: Google Earth - © 2018 Google / Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO e Edição de imagem: Adobe Photoshop CS6 (Windows).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do questionário aplicado aos produtores, foi feita a caracterização das fazendas observando o sistema de criação, manejo reprodutivo e sanitário, presença de outras espécies animais na propriedade, movimentação de animais e a ocorrência de doença na propriedade.

As coletas foram realizadas em propriedades de criação de vacas leiteiras em Lavras e cidades vizinhas, onde 3/54 (5,56%) possuíam criação mista tanto de leite como corte. O tipo de animas predominante é o europeu de leite em 33/54 (61,11%), seguido dos mestiços 19/54 (35,19%) e por último gado zebu com 2/54 (3,70%). O sistema de criação mais praticado na região é o semi-confinado 41/54 (75,93%), seguido pelo extensivo 10/54 (18,52%) e confinado (free-stall) 3/54 (5,56%) das fazendas coletadas. Todas as propriedades fazem ordenha duas vezes ao dia e o sistema de ordenhas mais utilizado é a sala de ordenha 36/54 (66,67%), seguida de ordenha ao pé 17/54 (31,48%) e somente 1 propriedade com ordenha manual. A mediana de vacas em lactação foi de 33,5 vacas e a mediana de produção diária nas propriedades foi de 485 litros de leite.

Os problemas sanitários relatados pelos proprietários durante as visitas foram mastite (85.19%), abortos (83.33%), ectoparasitas (83.33%), diarréia (66.67%), retenção de placenta (50%), pneumonias (33.33%), pododermatites (27.78%) e endoparasitoses (22.22%).

As fazendas possuem áreas alagadas 25/54 (46.30%), áreas de concentração de animais, onde os animais permanecem juntos, além do momento da ordenha 39/54 (72.22%).

Quanto a presença de outras espécies animais nas propriedades foram encontrados; ovinos 2/54 (3,70%), equinos 33/54 (61,11%), suínos 23/54 (42,50%), aves 41/54 (75,93%), cães 53/54 (98,15%), gatos 20/54 (37,04%), cervos 5/54

(9,26%), capivaras 16/54 (29,63%), felídeos 15/54 (27,78%), gambás 33/54 (61,11%), macacos 12/54 (22,22%).

As propriedades, foram questionadas sobre a sanidade do rebanho, com relação a vacinação utilizadas nos animais, contra brucelose 53/54 (98,15%), contra leptospirose 25/54 (46,30%) e contra diarreia viral bovina (BVD) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) foram 25/54 (46,30%). Em relação, aos testes de diagnóstico, realizados nos animais contra as principais doenças reprodutivas, os produtores responderam, em relação a brucelose 30/54 (55,56%) realizavam o teste, contra leptospirose 2/54 (3,70%), contra IBR/BVD 1/54 (1,85%) e contra neospora e língua azul nenhuma das fazendas realizavam testes.

Em relação a movimentação dos animais, nas propriedades coletadas, os produtores que tem o hábito de compram animais foram 39/54 (72,22%), adquiridos em feiras agropecuárias 6/54 (11,11%), de comerciantes 1/54 (1,85%) e de outras fazendas 33/54 (61,11%). E em relação a venda de animais 19/54 (35,19%), para onde são vendidos os animais, 2/54 (3,70%) são negociados em feiras agropecuárias, 2/54 (3,70%) para comerciantes e 16/54 (29,63%) para outras fazendas.

Nas fazendas visitadas em relação ao manejo reprodutivo, a monta natural está presente em (48.15%) das propriedades, seguida de monta natural e inseminação artificial (38.89%), e por último, somente inseminação artificial (12.96%). Segundo (Gastarini 2014) foram testados 53 amostras de sêmen de touros in natura, coletados em quatro diferentes municípios no Estado de Minas Gerais, em bovinos assintomáticos, diluídas e testadas na qRT-PCR e foram encontradas 24 (45,28%) animais positivos para VLA. Sêmen de touro também pode transmitir o vírus, mas somente durante o período de viremia (Bowen & Howard, 1984; Howard et al., 1985; Osburn, 1994; Kirkland et al., 2004).

Através do presente trabalho, observou-se na amostra 83,28% de animais, (488/586; IC95% = 80.0 - 86.21) soropositivos para o Vírus da Língua Azul. Das propriedades coletadas, 100% (54/54; IC95% = 93.4 - 100.0) possuíam pelo menos um animal positivo e, com prevalência que variaram de 45,45% à 100% dentro dos rebanhos (Figura 2), onde 12/54 das propriedades tiveram 100% dos animais coletados positivos. Estes resultados confirmam tanto a presença do vírus, como a importância dos bovinos leiteiros na manutenção do vírus na região coletada. Como foi descrito anteriormente, um fator para justificar a percentagem de animais com sorologia positiva para VLA é o fato de tratar-se de animais que vivem grande parte do tempo estabulados. Segundo Cunha et al. (1988) e Ward et al. (1996), são estes os animais mais susceptíveis aos vetores, talvez pela alta concentração dos animais ou pelas características das propriedades, tais como: umidade elevada e presença de água parada favorecendo a presença e multiplicação dos mosquitos. (Konrad et al. 2003) encontraram maior percentagem de bovinos com sorologia positiva em sistema de *free-stall* (75%).

A ampla distribuição desse vírus no estado é destacada na literatura como uma característica da região Sudeste do Brasil. Nessa região, o clima e as chuvas esparsas ao longo do ano, garantem umidade e temperatura adequadas para proliferação do mosquito vetor (Laender, 2002). Além disso, o amplo rebanho bovino da região também pode ser responsável pela manutenção do vírus, uma vez que essa espécie funciona como reservatório do mesmo.

Conforme estudos sorológicos no estado de Minas Gerais, nas Mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, com o intuito de verificar a distribuição e a prevalência da infecção pelo VLA em diferentes espécies animais. Em bovinos observou-se positividade em mais de 59% dos animais analisados (Konrad et al.,

2004).(Biihrer,et al 2017) em trabalho realizado no sul de Minas Gerais com ovinos teve uma soroprevalência de 54,13% com teste de IDGA.

Segundo (Tomich et al. 2009), as principais conseqüências econômicas da infecção pelo VLA são perdas diretas em virtude do aborto, queda do desempenho reprodutivo, redução da produção de leite e perda de condição corporal, além da restrição internacional de movimentação animal.

No Brasil a vacinação não é liberada e os sorotipos presentes no país que se conhece são o VLA 4 em 2013, os VLA 1,4 e 17 em 2014 ,os VLA 3,14 e 18 em 2015 e os VLA 19 e 22 no ano 2016.E encontrados em sêmen de touros os sorotipos VLA 4,8,10 e 16(Gasparini et al,2014). Limitar a propagação viral é a principal meta dos programas de controle para a doença (Maclachlan & Mayo 2013). Com relação ao vetor, *Culicoides*, deve-se ter conhecimento de seus hábitos fisiológicos, como periodicidade de vôo, atividade de alimentação, preferências por hospedeiros, habitat para oviposição e comportamento sazonal do clima local.

CONCLUSÃO

A LA é uma doença que sabidamente acomete os ruminantes domésticos do Brasil. No presente trabalho diagnosticou-se uma alta prevalência de animais positivos nas propriedades coletadas. Este é o primeiro registro de detecção de anticorpos anti-VLA em bovinos na região do sul de Minas Gerais. Faltam, no entanto, informações mais precisas sobre a sua epidemiologia e ocorrência no país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam I.A., Abdalla M.A., Mohamed M.E.H. & Aradaib I.E. 2014. Prevalence of bluetongue virus infection and associated risk factors among cattle in North Kordufan State, Western Sudan. **BMC Veterinary Research**. 10(1):94.
- Antoniassi, N. A. B.; Pavarini, S. P.; Ribeiro, L. A. O.; Silva, M. S.; Flores, E. F.; Driemeier, D. 2010. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo Vírus da Língua Azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,v. 30 (12),p. 1010–1016.
- Balaro, M. F. A.; Dos Santos Lima, M.; Del Fava, C.; De Oliveira, G. R.; Pituco, E. M.; Brandão, F. Z. 2014. Outbreak of Bluetongue Virus Serotype 4 in Dairy Sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26 (4), p.567–570.
- Biihrer, D.A. 2017. Inquérito sorológico da língua azul em ovinos de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras.
- Bowen, R.A.; Howard, T.H. 1984. Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus-containing bovine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1386–1388.
- Clavijo, A.; Sepulveda, L.; Riva, J.; Pessoa-Silva, M.; Tailor-Ruthes, A.; Lopez, J. W. 2002. Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America. **Veterinary Record**, v.151 (10),p. 301–302.

- Cunha, R.G.; Souza, D.M.; Teixeira, A. C. 1988. Incidência de anticorpos para o vírus da Língua Azul em soros de caprinos e ovinos do Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Fluminense Medicina Veterinária**. v.3, n.2, p. 53-56.
- Dorneles, E. M. S.; Morcatti, F. C.; Guimaraes, A. De S.; Lobato, Z. I. P.; Lage, A. P.; Goncalves, V. S. P.; Gouveia, A. M. G.; Heinemann, M. B.; Heinemann, M. B. 2012. Prevalence of Bluetongue Virus Antibodies in Sheep from Distrito Federal, Brazil. **Seminário Ciências Agrárias**,v.33 (4),p. 1521-1524.
- Gasparini, M. R. et al. 2014. Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de sêmen bovino para Bovine viral diarrhoea virus e Bluetongue virus utilizando RT-PCR convencional e em tempo real (qRT-PCR). Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**.
- Howard, T.H.; Bowen, R.A.; Pickett, B.W. 1985. Isolation of bluetongue virus from bull semen. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.178, p.127-134.
- Jenckel, M.; Bréard, E.; Schulz, C.; Sailleau, C.; Viarouge, C.; Hoffmann, B.; Höper, D.; Beer, M.; Zientara, S. 2015. Complete Coding Genome Sequence of Putative Novel Bluetongue Virus Serotype 27. **Genome Announcements**. 3 (2), e00016-15.
- Khair H.O.M., Adam I.A., Bushara S.B., Eltom K.H., Musa N.O. & Aradaib I.E.. 2014. Prevalence of bluetongue vírus antibodies and associated risk factors among cattle in East Darfur State, Western Sudan. **Irish Veterinary Journal** 67(1):4.
- Kirkland, P.D.; Melville, L.F.; Hunt, N.T.; Williams, C.F.; Davis, R.J. 2004. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. **Veterinaria Italiana**, v.40, p.497-501.
- Kjersti M., Aagaard-Tillery, Dalton Jess. Immunology of normal pregnancy. 2006. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine** , Volume 11 , Issue 5 , p. 279 – 295.
- Konrad, P. A.; Rodrigues, R. O.; Chagas, Â. C. P.; Paz, G. F.; Leite, R. C. 2003. Anticorpos Contra O Vírus Da Língua Azul Em Bovinos Leiteiros de Minas Gerais E Associações Com Problemas Reprodutivos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia** ,v. 10 p.117-125.
- Konrad, P.A.; Rodrigues, R.O.; Chagas, A.C.P.; Paz, G.F.; Leite, R.C. 2004. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associação com problemas reprodutivos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia - Uruguaiana**, v.10, p.42-51.
- Laender, J.O. 2002. Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise da evidência clínica e sorológica e identificação de Culicoides sp., 92p. Dissertação (Mestrado) – **Univ. Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**.
- Lima P.A., Utiumi K.U., Nakagaki K.Y.R., Biihrer D.A., Albuquerque A.S., Souza F.R., Matos A.C.D., Lobato Z.I.P., Driemeier D., Peconick A.P., Varaschin M.S. & Raymundo D.L.

2016. Diagnoses of Ovine Infection by the Serotype-4 Bluetongue Virus on Minas Gerais, **Brazil. Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, 44:1-5
- Lobão, F. M.; Melo, C. B.; Mendonça, C. E. D.; Leite, R. C.; Mcmanus, C.; Krewer, C. C.; Uzêda, R. S. 2014. Língua Azul Em Ovinos: Uma Revisão Bluetongue in Sheep: A Review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**.v. 38 (2),p. 69–74.
- Lobato, Z. I. P. 1999. Língua Azul: a doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.4, p.515-523.
- Lobato, Z. I. P.; Maldonado Coelho Guedes, M. I.; Diniz Matos, A. C. 2015. Bluetongue and Other Orbiviruses in South America: Gaps and Challenges. **Veterinaria Italian**,v.51 (4),p. 253–262.
- Maclachlan N.J. & Mayo C.E. 2013. Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging, Culicoides-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. **Antiviral Research** . v.99(2):p.79-90.
- Maclachlan, N. J. 2011.Bluetongue: History, Global Epidemiology, and Pathogenesis. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 102 (2), p.107–111.
- Ministerio De Estado Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, Instrução Normativa No 50, De 24 De Setembro De 2013.
- Mohammadi, A.; Tanzifi, P.; Nemati, Y. 2012. Seroepidemiology of Bluetongue Disease and Risk Factors in Small Ruminants of Shiraz Suburb, Fars Province, Iran. **Tropical Biomedicine**, v. 29 (4),p. 632–637.
- Osburn, B. I. 1994. Bluetongue virus. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, v. 10, n.3, p. 547-560.
- Osburn, B.I. 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, p.189–196.
- Schwartz-Cornil, I.; Mertens, P.P.C.; Contreras, V.; Hemati, B.; Pascale, F.; Bréard, E.; Mellor, P.S.; Maclachlan, N.J.; Zientara, S. 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Veterinary Research**, v.39, n.5, p.1-16.
- Sok, J.; Hogeveen, H.; Elbers, A. R. W.; Velthuis, A. G. J.; Oude Lansink, A. G. J. M. 2014. Expected Utility of Voluntary Vaccination in the Middle of an Emergent Bluetongue Virus Serotype 8 Epidemic: A Decision Analysis Parameterized for Dutch Circumstances. **Preventive Veterinary Medicine**, v.115 (3),p. 75–87.
- Tomich, R. G. P; Nogueira M.F.; Lacerda A.C.R.; Campos F.S.; Tomas W.M.; Herrera H.M.; Lima-Borges P.A.; Pellegrin A.O.; Lobato Z.I.P.; Silva R.A.M.S.; Pellegrin L.A.; Barbosa-Stancioli E.F.,2009. 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.

- Tomich, R. G. P. Processo saúde-doença de bovinos em rebanhos de assentamentos rurais do município de Corumbá, MS. 2007. 182 f. Tese (Doutorado em Microbiologia), **Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**.
- Ward, M.P. 1996. Climatic factors associated whit the infection of herds of cattle with bluetongue viruses. **Veterinary Research Communications**, v.20, p. 273-283.
- World Organisation For Animal Health, 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees, 6th ed.; OIE: Paris.
- World Organisation For Animal Health, 2016. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2016 <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016>.
- Zhang, B.; Bilder, C.; Biggerstaff, B.; Schaarschmidt, F. 2011. Bingroup: evaluation and experimental design for binomial group testing.

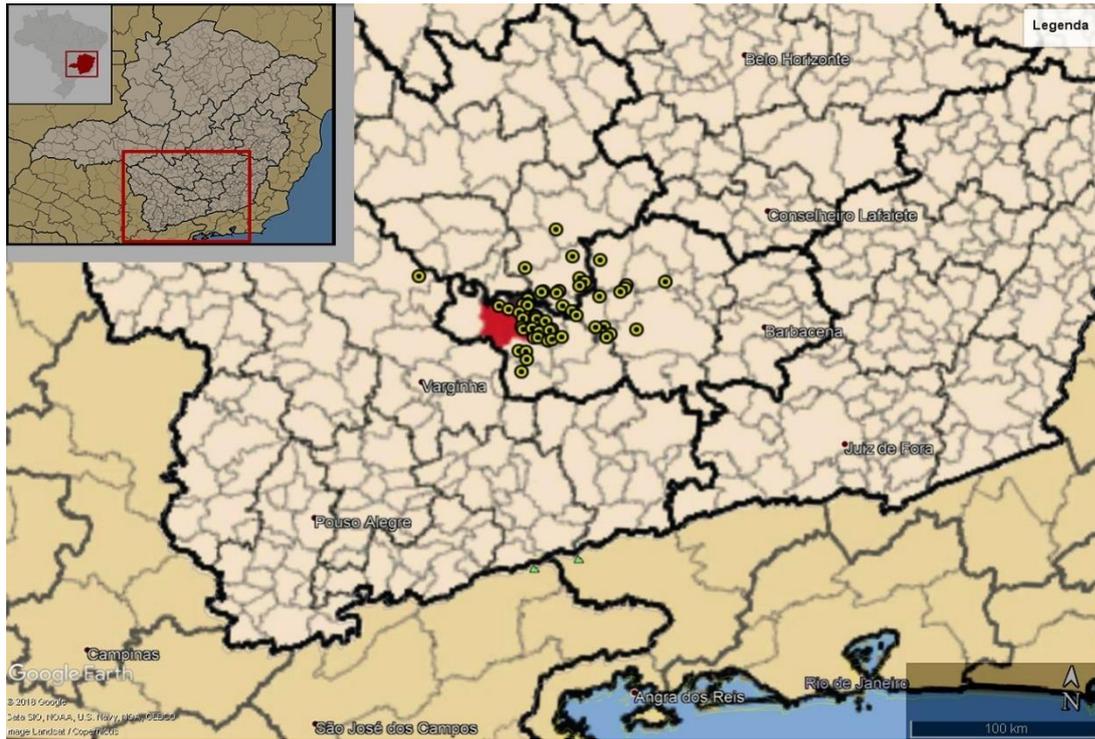
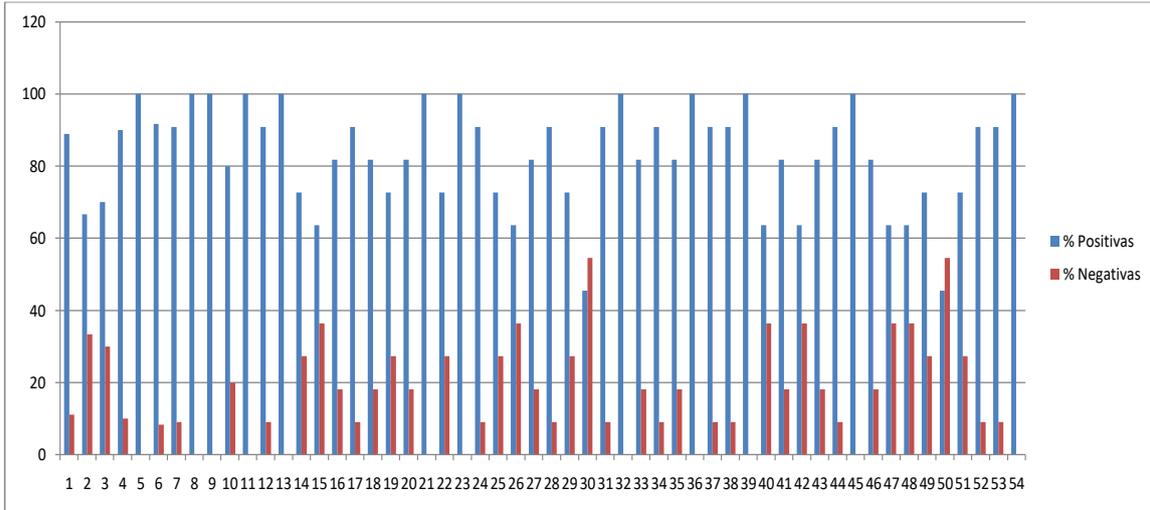


Figura 1 - Distribuição de propriedades de bovinos leiteiros pesquisadas para a ocorrência do Vírus da Língua Azul em Lavras e região, Minas Gerais, no ano de 2018.



Fig

ura 2 - Percentagens de soropositividade para Língua Azul nas fazendas pesquisadas para a ocorrência do Vírus da Língua Azul em Lavras e região, Minas Gerais, no ano de 2018.

