

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Ronaldo Michel Bianchi

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
ANATOMOPATOLÓGICOS DE SURTOS DE LÍNGUA AZUL EM
OVINOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Santa Maria, RS
2016

Ronaldo Michel Bianchi

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DE
SURTOS DE LÍNGUA AZUL EM OVINOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof° Dr°. Rafael A. Fighera

Santa Maria, RS
2016

Ronaldo Michel Bianchi

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DE
SURTOS DE LÍNGUA AZUL EM OVINOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2016:

Rafael Almeida Figuera, Dr, UFSM
(Presidente/Orientador)

Marcia Cristina da Silva, Dra, UFSM

Eduardo Kenji Masuda, Dr, (Axys Análises)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho ocorreu pelo auxílio, apoio e dedicação de diversas pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este estudo pudesse ser concluído, em especial agradeço:

- à minha família; aos meus pais Gilmar e Ivanete Bianchi e ao meu irmão João Vítor Bianchi, por todo o apoio, amor, educação e incentivo que tiveram comigo em todos os momentos;

- aos amigos, bolsistas e pós-graduandos do LPV-UFSM, em especial, a Welden Panziera, Taiara Müller e Tatiane Faccin pela grande amizade, pela ajuda, pelos ensinamentos e pelo apoio;

- à Juliana Cargnelutti, Gisane de Almeida e Rodrigo Leon pela amizade, pelos ensinamentos e por toda a ajuda durante o período de estudo;

- ao meu orientador Rafael Figuera pelos ensinamentos;

- aos professores do LPV–UFSM, Glaucia Kommers, Marcia da Silva e Luiz Francisco Irigoyen pelos ensinamentos e apoio;

- ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM pela oportunidade de realizar o mestrado;

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação.

RESUMO

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DE SURTOS DE LÍNGUA AZUL EM OVINOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

AUTOR: Ronaldo Michel Bianchi
ORIENTADOR: Rafael A. Fighera

Língua azul ou *bluetongue* (BT) é uma doença infecciosa causada pelo vírus da língua azul (BTV), que é transmitido por vetores hematófagos do gênero *Culicoides* e acomete ruminantes domésticos e selvagens, porém sua manifestação clínica é vista basicamente em ovinos. Atualmente, 26 sorotipos do BTV são conhecidos mundialmente. Entretanto, informações sobre a doença no Brasil são limitadas, com apenas dois sorotipos descritos. Pesquisas sorológicas revelam que o Rio Grande do Sul (RS) possui as menores taxas de prevalência de infecção entre os Estados brasileiros. O objetivo deste trabalho é descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos de 17 surtos de BT em ovinos na Região Central do RS. Para isso foram realizadas visitas às propriedades em que ocorreram os surtos para investigação epidemiológica e clínica, realização de necropsias e coleta de amostras. Os surtos foram sazonais e ocorreram durante o verão e outono. Em 17 pequenos rebanhos, de um total de 884 ovinos, 180 adoeceram (20,4%). Ovinos de todas as faixas etárias, da raça Texel e sem raça definida, foram acometidos. Entretanto, ovinos com menos de um ano de idade tiveram taxa de morbidade maior do que ovinos com um ano ou mais. Os sinais clínicos mais frequentes caracterizaram-se por anorexia, apatia, acentuada perda de peso, edema facial, envolvendo principalmente os lábios, e secreção nasal seromucosa e esverdeada. Edema pulmonar, necrose da musculatura cardíaca e esquelética e do músculo estriado do esôfago foram as lesões mais prevalentes. Erosões e úlceras no trato gastrointestinal superior e hemorragia na artéria pulmonar também foram comuns. O genoma do BTV foi detectado por meio da RT-PCR em amostras de sangue, baço e pulmão de 21 animais dos 17 surtos. O vírus envolvido no surto 3 foi isolado e pertence ao sorotipo 17, que pela primeira vez é descrito no Brasil. A sorologia foi realizada pelo método de imunodifusão em gel de ágar e demonstrou que 17 dos 20 bovinos que estavam em contato com os ovinos infectados soroconverteram ao BTV. Em síntese, nossos dados permitem concluir que o BTV é o agente causador dos surtos e indicam que a Região Central do RS é uma área de risco para a ocorrência de BT em ovinos, uma doença, até então, não reconhecida nessa região.

Palavras-chave: Doenças de ovinos, Vírus da língua azul, *Culicoides* sp., Infecção natural, Patologia veterinária.

ABSTRACT

CLINICAL, PATHOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF OUTBREAKS OF BLUETONGUE DISEASE IN SHEEP IN THE CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Ronaldo Michel Bianchi

ADVISOR: Rafael A. Figuera

Bluetongue (BT) is an infectious disease caused by bluetongue virus (BTV), which is transmitted by biting midges of the genus *Culicoides*, and affects domestic and wild ruminants, but its clinical manifestation is seen basically in sheep. Currently, 26 BTV serotypes are recognized worldwide. However, information about the disease in Brazil are limited, as only two BTV serotypes have been reported. Serological surveys reveal that Rio Grande do Sul (RS) has the lowest prevalence rates of infection among Brazilian states. This article describes the clinical, pathological and epidemiological aspects of 17 outbreaks of BT disease in sheep in the Central Region of RS state, Southern Brazil. Affected farms were visited for clinical examination, necropsy, sample collection and epidemiological investigation. The outbreaks were seasonal and occurred during the summer and fall. Of the 884 sheep in 17 small herds, 180 (20.4%) were affected. All ages of Texel and mixed breed sheep were affected. However, lambs (younger than one year) had higher morbidity than adult sheep. The most frequent clinical signs were anorexia, lethargy, loss of body condition, facial swelling mainly involving the lips, and greenish seromucous nasal discharge. Pulmonary edema, cardiac, skeletal muscle and esophageal striated muscle necrosis were the most prevalent findings. Erosive and ulcerative lesions in the upper gastrointestinal tract, and hemorrhage in the pulmonary artery also were common. The bluetongue virus (BTV) genome was detected by RT-PCR in blood, spleen, and lungs samples of 21 animals from 17 outbreaks. The virus involved in the outbreak 3 was isolated and shown to belong to serotype 17, for the first time reported in Brazil. Serology performed by agar gel immunodiffusion test (AGID) in 20 contact cattle showed seroconversion to BTV in 17 animals. In summary, our data support the BTV as the etiological agent of the outbreaks and indicate that the central region of RS is an area at risk for BT in sheep, a disease previously not recognized in the region.

Keywords: Diseases of Sheep, Bluetongue Virus, *Culicoides* sp., Natural Infection, Veterinary Pathology.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
ARTIGO 1 - CLINICAL, PATHOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF OUTBREAKS OF BLUETONGUE DISEASE IN SHEEP IN THE CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL	14
Abstract	15
Resumo	15
Introduction	16
Materials and methods	16
Results	17
Epidemiology.....	17
Clinical signs	17
Gross lesions.....	17
Histological lesions.....	18
Virological findings	18
Discussion	18
Conclusion	21
References	21
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A - AMOSTRAS E EXAMES EM CASOS DE SUSPEITA DE LÍNGUA AZUL EM OVINOS	40

1. INTRODUÇÃO

Língua azul ou *bluetongue* (BT) é uma doença infecciosa e não contagiosa de notificação obrigatória imediata, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA [2013]). A doença pertence à lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE [2015]), pois está relacionada a sérios problemas socioeconômicos e sanitários, provocados pelo grande impacto na produção animal e no comércio internacional (RADOSTITS et al., 2007).

A doença é causada pelo vírus da língua azul (BTV), um vírus RNA fita dupla, não envelopado e segmentado, pertencente ao gênero *Orbivirus* e à família Reoviridae, que é transmitido por vetores hematófagos do gênero *Culicoides* (ANTHONY et al., 2007; BROWN et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIET-CORREA, 2007; CAPAROLE et al., 2011; ALFIERI et al., 2012). Ruminantes domésticos e selvagens podem ser acometidos, porém a manifestação clínica da doença é vista principalmente em ovinos, e raramente em bovinos, os quais atuam basicamente como reservatório do vírus (MACLACHLAN, 1990; GIBBS; GREINER, 1994; BARNARD et al., 1998, BROWN et al., 2007; MACLACHLAN et al., 2009; ALFIERI et al., 2012).

Atualmente, 26 sorotipos do BTV são conhecidos mundialmente (MAAN et al., 2012); e são descritos principalmente na Europa, nos Estados Unidos, na Austrália e na África do Sul (MACLACHLAN et al., 2009; MAAN et al., 2012; MACLACHLAN; MAYO, 2013). Entretanto, informações sobre os sorotipos de BTV presentes na América do Sul são limitadas (CLAVIJO et al., 2002). No Brasil, até o momento, apenas dois sorotipos foram descritos. O sorotipo 4, isolado em 1980 de bovinos brasileiros mantidos em quarentena nos Estados Unidos (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982) e, mais recentemente (2013 e 2014), isolado em ovinos no Rio de Janeiro (BALARO et al., 2014), Minas Gerais (LIMA et al., 2014) e Rio Grande do Sul (GUIMARÃES, 2015); e o sorotipo 12 isolado em ovinos e caprinos no Paraná em 2001 (CLAVIJO et al., 2002) e em ovinos no Rio Grande do Sul em 2009 (ANTONIASSI et al., 2010). Quanto a inquéritos sorológicos, o primeiro relato da infecção pelo BTV na América do Sul ocorreu no Brasil em 1978 e desde então vários estudos têm determinado que a infecção está amplamente difundida em todo o território nacional, porém, basicamente sem causar doença (LAGER, 2004;

COSTA et al., 2006; LOBÃO et al., 2014). Dentre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul apresenta as menores prevalências da infecção, provavelmente devido ao clima, que não favorece a sobrevivência do vetor durante todo o ano (ALFIERI et al., 2012).

Epidemiologicamente, fatores relacionados ao vírus, ao vetor, ao ambiente e ao hospedeiro definitivo podem influenciar na ocorrência e severidade dos surtos (MACLACHLAN, 1994; GIBBS; GREINER, 1994; RADOSTITS et al., 2007; WILLIAMSON et al., 2008; ALFIERI et al., 2012). Os vírus dos sorogrupos da BT têm grande variabilidade genética (MACLACHLAN, 1994), com diferenças na virulência entre os sorotipos e as cepas virais (RADOSTITS et al., 2007). Além disso, como a doença não é contagiosa, o papel do vetor é fundamental para a transmissão e sobrevivência do vírus, e a infecção pelo BTV somente ocorre quando vetores competentes estão presentes (MACLACHLAN, 1994; RADOSTITS et al., 2007).

O clima é o maior fator de risco para a ocorrência de BT (RADOSTITS et al., 2007; GOULD; HIGGS, 2009). Doenças transmitidas por vetores são altamente sensíveis a mudanças climáticas e podem influenciar sua distribuição geográfica e incidência (MEDLOCK; LEACH, 2015). Língua azul ocorre em ambientes com condições que favoreçam a proliferação do vetor. Estas incluem áreas de clima quente, com umidade elevada e ambiente favorável para o desenvolvimento das larvas do mosquito, como áreas com água estagnada e/ou com excesso de matéria orgânica (MACLACHLAN, 1994; RADOSTITS et al., 2007). Estações quentes e chuvosas favorecem o aparecimento de *Culicoides* spp. e, conseqüentemente, a maior transmissão do vírus (BARNARD et al., 1998; ALFIERI et al., 2012). Desta forma, em climas temperados, também chamados de áreas epidêmicas, os surtos normalmente são esporádicos e sazonais, ocorrem durante o verão e início do outono e cessam após os primeiros frios (MACLACHLAN, 1994; GIBBS; GREINER, 1994; RIET-CORREA, 2007; MACLACHLAN, 2011).

Fatores relacionados ao hospedeiro que influenciam na ocorrência da doença incluem estado imunológico e nutricional, estresse, exposição à radiação ultravioleta, raça e idade (MACLACHLAN, 1994; GIBBS; GREINER, 1994; BROWN et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; MACLACHLAN et al., 2009). Raças ovinas originárias de climas frios e/ou temperados, como a Merino, são mais suscetíveis à infecção e ao desenvolvimento da doença. Já raças nativas das áreas tropicais são suscetíveis à infecção, porém, não desenvolvem a doença. Além disso, considera-se que ovinos

com mais de 3-4 anos de idade são mais afetados por BT (MACLACHLAN, 1994; GIBBS; GREINER, 1994).

A perpetuação do BTV também depende de rebanhos de ruminantes susceptíveis ao vírus (MACLACHLAN, 1994). Os surtos podem ocorrer quando ruminantes suscetíveis são introduzidos em áreas endêmicas para a BT, quando uma cepa exótica é introduzida nessas áreas ou quando o vírus se espalha para populações imunologicamente suscetíveis nas áreas de transição entre as regiões endêmicas e não endêmicas, através da entrada de um ruminante virêmico ou pela movimentação dos ventos carreando *Culicoides* spp. infectados com o BTV (MACLACHLAN, 1994; GIBBS; GREINER, 1994; RADOSTITS et al., 2007; WILLIAMSON et al., 2008; WILSON; MELLOR, 2008; MACLACHLAN et al., 2009).

As taxas de morbidade e mortalidade podem variar substancialmente entre os surtos (MACLACHLAN et al., 2009). Quando a doença ocorre pela primeira vez em um rebanho a morbidade pode chegar a 50-75% e a mortalidade a 20-50% (RADOSTITS et al., 2007; RIET-CORREA, 2007). Entretanto, tipicamente, a taxa de mortalidade raramente ultrapassa 30% (MACLACHLAN et al., 2009) e permanece entre 1-10% (GUEDES et al., 2010).

Os sinais clínicos e as lesões que ocorrem na BT são devido às características patogênicas do BTV. Após inoculação cutânea, o vírus segue para os linfonodos regionais onde realiza uma replicação inicial. Posteriormente dissemina-se para uma variedade de tecidos, mas principalmente tecidos linfoides e pulmão, onde uma nova replicação ocorre principalmente em fagócitos, células endoteliais e linfócitos. A viremia é altamente associada às células, principalmente plaquetas e eritrócitos. No entanto, devido à meia-vida das plaquetas ser curta, nos estádios mais tardios da infecção o vírus é basicamente associado aos eritrócitos (BROWN et al., 2007; MACLACHLAN et al., 2009; MACLACHLAN, 2011). A replicação do vírus em células endoteliais de capilares e de pequenos vasos sanguíneos causa mudanças degenerativas, necróticas e hiperplásicas do endotélio, que alteram a permeabilidade vascular, resultando em edema, congestão, hemorragia, trombose e necrose (RADOSTITS et al., 2007; WILLIAMSON et al., 2008; MACLACHLAN et al., 2009). Além disso, o vírus induz, indiretamente, a liberação de mediadores vasoativos e inflamatórios pelas células infectadas, principalmente por plaquetas, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. Isso contribui para o agravamento do dano vascular (MACLACHLAN et al., 2009).

Em ovinos, o período de incubação varia entre cinco e dez dias (ALFIERI et al., 2012) e a duração do quadro clínico é variável (ANTONIASSI et al., 2010). As manifestações clínicas podem estar ausentes ou ocorrerem de forma aguda e fulminante (BROWN et al., 2007; ALFIERI et al., 2012). Em áreas endêmicas, a doença é rara, geralmente ocorrendo em animais vindos de áreas livres (ALFIERI et al., 2012). Os sinais clínicos incluem febre, queda da lã, anorexia, apatia, emagrecimento, secreção nasal serosa a mucossanguinolenta, com formação de crostas no focinho, dispneia, edema na face, principalmente nos lábios, hiperemia nos lábios e na mucosa oral, com posterior formação de erosões e úlceras. A língua pode estar edemaciada, e ocasionalmente torna-se cianótica, o que dá o nome à doença. Dificuldade de locomoção, fraqueza e hiperemia da banda coronária podem ocorrer associadas às lesões musculares e nos cascos (CLAVIJO et al., 2002; NAVARRE et al., 2002; BROWN et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIET-CORREA, 2007; WILLIAMSON et al., 2008; ELBERS et al., 2008; MACLACHLAN et al., 2009; ANTONIASSI et al., 2010; GUEDES et al., 2010; ALFIERI et al., 2012; BALARO et al., 2014; LIMA et al., 2014; GUIMARÃES, 2015). Transtornos reprodutivos, que incluem morte embrionária, abortos, malformações fetais e infertilidade também podem ser observados (OSBURN, 1994; BROWN et al., 2007; RIET-CORREA, 2007).

Macroscopicamente pode-se observar hiperemia, hemorragia, erosão e ulceração do trato gastrointestinal superior, hemorragias no subcutâneo, na artéria pulmonar e no coração, edema pulmonar, efusão pleural e pericárdica, edema facial e submandibular, secreção nasal mucosa a sanguinolenta e necrose dos músculos esquelético e cardíaco. Ocasionalmente há pneumonia por aspiração em consequência das lesões esofágicas (CLAVIJO et al., 2002; BROWN et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIET-CORREA, 2007; WILLIAMSON et al., 2008; MACLACHLAN et al., 2009; ANTONIASSI et al., 2010; GUEDES et al., 2010; ALFIERI et al., 2012; BALARO et al., 2014).

As lesões histológicas refletem as alterações macroscópicas (MACLACHLAN et al., 2009) e incluem, nos músculos esquelético e cardíaco e na musculatura esofágica, mionecrose com hemorragia nos casos agudos e infiltração por células inflamatórias mononucleares e fibrose nos casos crônicos. Pequenos vasos sanguíneos podem apresentar hipertrofia do endotélio, degeneração e necrose fibrinoide. Estomatite, glossite e ruminite erosivas e ulcerativas também são achados

histológicos frequentes (CLAVIJO et al., 2002; BROWN et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIET-CORREA, 2007; WILLIAMSON et al., 2008; MACLACHLAN et al., 2009; ANTONIASSI et al., 2010; GUEDES et al., 2010; ALFIERI et al., 2012; BALARO et al., 2014).

A associação dos achados epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos permite o diagnóstico presuntivo da doença e o diagnóstico definitivo é feito por meio de exames virológicos. Devem ser colhidas amostras de sangue total e soro de vários animais do rebanho, assim como fragmentos de baço, linfonodos e pulmão daqueles submetidos à necropsia. No caso de cordeiros e bezerros com problemas congênitos, amostras do sistema nervoso também devem ser colhidas (ALFIERI et al., 2012).

O diagnóstico sorológico é feito por meio das técnicas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e de ensaio imunoenzimático associado à enzima (ELISA), que identificam a exposição de animais a vírus do sorogrupo BTV (AFSHAR, 1994; ALFIERI et al., 2012), porém, estes testes são mais utilizados para vigilância epidemiológica do que para o diagnóstico da doença (ALFIERI et al., 2012). Para a detecção do vírus em amostras de sangue e tecido, a inoculação intravenosa em ovos embrionados é o teste mais sensível, seguida pelo cultivo em células BHK, com identificação do grupo BTV geralmente realizada pela imunofluorescência direta (IFD [AFSHAR, 1994; ALFIERI et al., 2012]). O isolamento viral em cultivo celular é particularmente difícil (ALFIERI et al., 2012). Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR), têm sido utilizados para detectar o ácido nucleico viral em amostras de sangue, de tecidos e em vetores e mostra-se um método rápido, confiável e eficiente (ANTHONY et al., 2007; ALFIERI et al., 2012). Vide em Anexo A, resumidamente, as amostras que podem ser colhidas e os exames que podem ser requisitados na suspeita de casos de língua azul em ovinos.

O diagnóstico diferencial de BT deve ser feito com outras doenças que causam edema, hemorragia e necrose epitelial (WILLIAMSON et al., 2008). Em ovinos deve-se incluir principalmente o ectima contagioso, a febre aftosa, a estomatite vesicular, doença epizoótica hemorrágica dos cervídeos e a fotossensibilização (RIET-CORREA, 2007; WILLIAMSON et al., 2008; ALFIERI et al., 2012). No ectima contagioso as lesões caracterizam-se por crostas envolvendo principalmente a comissura labial, e podem disseminar-se pra outros locais como

focinho, fossas nasais, área periocular, gengiva, língua, palato e esôfago. Ainda, histologicamente, pode-se observar corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos no epitélio afetado. Portanto, apenas nas formas graves as lesões podem ser confundidas com língua azul (BARROS, 2007; GINN et al., 2007; GELBERG, 2013). Estomatite vesicular e febre aftosa caracterizam-se por lesões vesiculares na cavidade oral, envolvendo principalmente os lábios, o palato dorsal e a língua. Na febre aftosa também podem ser observadas nas bandas coronárias e tetos (BROWN et al., 2007; PRADO; RIET-CORREA, 2007; GELBERG, 2013). Na fotossensibilização, as lesões estão localizadas nas áreas do corpo de pele e pelo não pigmentados e sobre as partes do corpo expostas ao sol. Em ovinos com lã pesada as lesões ocorrem nos pavilhões auriculares, pálpebras, face e nariz. Em ovinos tosquiados as lesões podem ocorrer no dorso. Também pode ocorrer acentuado edema facial (“cara inchada” ou “eczema facial” [GINN et al., 2007; HARGIS; GINN, 2013]). Doença epizoótica hemorrágica dos cervídeos também é provocada por um orbivírus e as lesões são semelhantes às causadas pelo BTV. No entanto, casos desta doença em ovinos são incomuns (ALFIERI ET AL., 2012). Além disso, lesões como necrose muscular associada à mineralização podem lembrar as observadas em casos de distrofia muscular nutricional (DMN), causada por deficiência de vitamina E e selênio. No entanto, a DMN caracteriza-se por áreas brancas nos grandes grupos musculares com aspecto de pó de giz na superfície muscular (ANTONIASSI et al., 2010).

O tratamento é somente de suporte. Antibióticos de amplo espectro são indicados para evitar infecções bacterianas secundárias. Anti-inflamatórios não esteroidais para controle da inflamação, febre e dor. Assim como suporte nutricional e hídrico é necessário se os animais afetados não podem comer e/ou beber (NAVARRE et al., 2002).

O controle da infecção pelo BTV é difícil pela pluralidade de sorotipos e pela ubiquidade do comportamento alimentar do vetor (MACLACHLAN; MAYO, 2013). Além disso, como a infecção pelo BTV pode ocorrer sem evidência clínica, sobretudo em bovinos, a infecção pode se disseminar de maneira despercebida. Desta forma, medidas podem ser adotadas para minimizar os prejuízos causados pela doença (ALFIERI et al., 2012). O controle pode ser feito por meio da redução da população do vetor utilizando inseticidas, mas esse método é pouco prático para uso rotineiro e pode resultar em problemas ambientais, além de ser muito caro e

economicamente inviável. Medidas restritivas para a introdução de ruminantes nas propriedades também podem ser adotadas; os animais devem ser submetidos a quarentena e apresentar certificado zoosanitário, com resultados negativos em testes de isolamento viral ou PCR a partir de amostras de sangue total (RADOSTITS et al., 2007; ALFIERI et al., 2012; MACLACHLAN; MAYO, 2013). A vacinação é a medida preventiva mais utilizada em países onde BT constitui um problema sanitário importante. No Brasil não existem vacinas (ALFIERI et al., 2012), mas os animais recuperados da infecção são resistentes à reinfecção com sorotipos virais homólogos, que é a base das estratégias de vacinação para prevenir a infecção pelo BTV e a doença (MACLACHLAN et al., 2014).

Como informações sobre a doença no Brasil são limitadas, com apenas dois sorotipos identificados, e pesquisas sorológicas revelaram que o Rio Grande do Sul apresenta as menores taxas de prevalência da infecção no Brasil, o objetivo deste estudo é descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos de surtos de BT em ovinos na Região Central do Rio Grande Sul, dando ênfase a sua importância no cenário local. Este estudo resultou em um trabalho científico. A introdução, material e métodos, resultados e discussão deste trabalho são incluídas na íntegra a seguir.

2. ARTIGO 1

Clinical, pathological and epidemiological aspects of outbreaks of bluetongue disease in sheep in the central region of Rio Grande do Sul

Ronaldo M. Bianchi, Welden Panziera, Tatiane C. Faccin, Gisane L. de Almeida, Juliana F. Cargnelutti, Eduardo F. Flores, Glauca D. Kommers e Rafael A. Fighera

(Artigo aceito pela revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

Clinical, pathological and epidemiological aspects of outbreaks of bluetongue disease in sheep in the Central Region of Rio Grande do Sul¹

Ronaldo M. Bianchi^{2*}, Welden Panziera², Tatiane C. Faccin², Gisane L. de Almeida³, Juliana F. Cargnelutti⁴, Eduardo F. Flores⁴, Glaucia D. Kommers⁵ e Rafael A. Fighera⁵

ABSTRACT.- Bianchi R.M., Panziera W., Faccin T.C., Cargnelutti J.F., Almeida G.L., Leon R.M., Flores E.F., Kommers G.D. & Fighera R.A. 2015. **Clinical, pathological and epidemiological aspects of outbreaks of bluetongue disease in sheep in the central region of Rio Grande do Sul.** Pesquisa Veterinária Brasileira 00(00)00-00. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: romichelbianchi@yahoo.com.br

This article describes the clinical, pathological and epidemiological aspects of 17 outbreaks of bluetongue (BT) disease in sheep occurring between December 2014 and June 2015 in the Central Region of Rio Grande do Sul state (RS), Southern Brazil. Affected farms were visited for clinical examination, necropsy, sample collection and epidemiological investigation. The outbreaks were seasonal and occurred during the summer and autumn. A total of 180 sheep (20.4%) out of 884 in 17 small herds were affected. All ages of Texel and mixed breed sheep were affected. However, lambs (younger than one year) had higher morbidity than adult sheep. The most frequent clinical signs were anorexia, lethargy, loss of body condition, facial swelling mainly involving the lips, and greenish seromucous or mucous nasal discharge. Pulmonary lesions characterized by edema were the most prevalent findings; however, erosive and ulcerative lesions in the upper gastrointestinal tract, as well as cardiac, skeletal muscle and esophageal striated muscle necrosis, and hemorrhage in the pulmonary artery were also frequent. The bluetongue virus (BTV) genome was detected by RT-PCR in blood and tissue samples (spleen and lungs) of 21 animals from 17 outbreaks. The virus involved in the outbreak 3 was subsequently isolated and shown to belong to serotype 17, for the first time reported in Brazil. Serology performed by agar gel immunodiffusion test (AGID) in 20 contact cattle showed seroconversion to BTV in 17 animals. In summary, our data support the BTV as the etiological agent of the outbreaks and indicate that the central region of RS is an area at risk for BT in sheep, a disease previously not recognized in the region.

INDEX TERMS: diseases of sheep, bluetongue virus, *Culicoides* sp., natural infection, veterinary pathology.

¹ Received on.....

Accepted for publication on.....

This paper is part of the requirements for the fulfillment of the degree of Master of Science by the first author.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. *Corresponding author: romichelbianchi@yahoo.com.br

³ Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI), Av. Fernando Ferrari 1996, Santa Maria, RS 97050-800, Brazil.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

⁵ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

RESUMO.- [Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de surtos de língua azul em ovinos na Região Central do Rio Grande do Sul.] O objetivo deste artigo é descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos de 17 surtos de língua azul (BT) em ovinos, que ocorreram entre dezembro de 2014 a junho de 2015, na Região Central do Rio Grande do Sul. Para isso, foram realizadas visitas as propriedades nas quais ocorreram surtos da doença para investigação epidemiológica e clínica, realização de necropsias e coleta de amostras. Os surtos foram sazonais e ocorreram durante o verão e outono. Em 17 pequenos rebanhos, de um total de 884 ovinos, 180 adoeceram (20,4%). Ovinos de todas as faixas etárias, da raça Texel e sem raça definida, foram acometidos. Entretanto, ovinos com menos de um ano de idade tiveram taxa de morbidade maior do que ovinos com um ano ou mais. Os sinais clínicos mais frequentes caracterizaram-se por anorexia, apatia, acentuada perda de peso, edema facial, envolvendo principalmente os lábios, e secreção nasal seromucosa ou muco-esverdeada. Lesões pulmonares,

caracterizadas por edema, foram as mais prevalentes. Porém, lesões erosivas e ulcerativas no trato gastrointestinal superior, assim como necrose da musculatura cardíaca e esquelética e do músculo estriado do esôfago e hemorragia na artéria pulmonar foram frequentes. O genoma do BTV foi detectado por RT-PCR em amostras de sangue e tecidos (baço e pulmão) de 21 animais de 17 surtos. O vírus envolvido no surto 3 foi subsequentemente isolado e pertence ao sorotipo 17, que pela primeira vez é descrito no Brasil. A sorologia foi realizada pelo método de imunodifusão em ágar gel e demonstrou que 17 dos 20 bovinos que estavam em contato com os ovinos infectados soroconverteram ao BTV. Em síntese, nossos dados permitem concluir que o BTV é o agente causador dos surtos e indicam que a Região Central do RS é uma área de risco para a ocorrência de BT em ovinos, uma doença, até então, não reconhecida nessa região.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: doenças de ovinos, vírus da língua azul, *Culicoides* sp., infecção natural, patologia veterinária.

INTRODUCTION

Bluetongue (BT) is an infectious, non-contagious disease caused by bluetongue virus (BTV), a segmented, non-enveloped double-stranded RNA virus belonging to the genus *Orbivirus*, family *Reoviridae*. BTV is primarily transmitted by biting midges of the genus *Culicoides* (Anthony et al. 2007, Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007, Caparole et al. 2011, Alfieri et al. 2012). The disease affects domestic and wild ruminants, however, the clinical manifestations are seen almost exclusively in sheep and rarely in cattle, which may act as reservoirs of the virus (Maclachlan 1990, Gibbs & Greiner 1994, Barnard et al. 1998, Maclachlan et al. 2009, Alfieri et al. 2012).

According to the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Department of Agriculture, Livestock, and Supply) (2013) BT is considered an immediately notifiable disease. It is included in the list of the World Organization for Animal Health (OIE) (Radostits et al. 2007).

Currently, 26 BTV serotypes are recognized worldwide (Maan et al. 2012), mainly in Europe, United States, Australia and South Africa (Maclachlan et al. 2009, Maan et al. 2012, Maclachlan & Mayo 2013). Data on the BTV serotypes circulating in South America are limited (Clavijo et al. 2002). In Brazil, only two BTV serotypes have been reported. The serotype 4 was isolated in 1980 in Brazilian cattle kept in quarantine in the United States (Grocock & Campbell 1982) and, more recently (2013 and 2014), in sheep in the States of Rio de Janeiro (Balanaro et al. 2014), Minas Gerais (Lima et al. 2014) and Rio Grande do Sul (RS) (Guimarães 2015). The serotype 12 was isolated in sheep and goats in 2001 in the State of Paraná (Clavijo et al. 2002) and in sheep in 2009 in RS (Antoniassi et al. 2010). The first serological evidence of BTV infection in South America was in Brazil in 1978 and, since then, several serological surveys have indicated that the infection is widespread in the country. Nonetheless, most infections probably go unnoticed, without overt clinical manifestations (Lager 2004, Costa et al. 2006, Lobão et al. 2014).

The aim of this report is to describe the clinical, epidemiological, and pathological aspects of 17 outbreaks of BT disease in sheep that occurred between 2014 and 2015 in the central region of RS, Southern Brazil, to emphasize its importance to this region.

MATERIALS AND METHODS

Clinical and epidemiological data were obtained from farmers and veterinarians. The visits to affected farms were supported by veterinarians from the Animal Health Service of Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI) of RS State. The farms were numbered from F1 to F17 and the cases occurred in each farm were considered as an outbreak (O1 to O17). Seventeen sheep that died in the outbreaks were necropsied. These animals were obtained from nine farms (F1, F2, F3, F6, F11, F12, F15, F16 e F17) and they were identified as S1-S17. Fragments of several organs were collected at necropsy, fixed in 10% buffered formalin, processed routinely for histology, and stained with hematoxylin-eosin (HE). Spleen and lung samples from nine necropsied sheep were packed in RNA Later solution (ThermoFisher Scientific, Ambion, Waltham, MA USA), and maintained under refrigeration. In addition, whole blood samples were collected in tubes with EDTA of sheep from most farms, with the exception of F12, F15, F16, and F17, and placed in refrigerated cooler. Blood samples for serology were also collected of cattle kept in close contact with sheep in the farms where the outbreaks occurred.

Blood, spleen, and lung samples were submitted to BTV detection by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA extraction was performed using Trizol reagent (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, MA USA). Before complementary DNA confection (using SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix kit by ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, MA USA), total RNA were heat at 95°C, 5 min. cDNA were submitted to PCR to amplify 104pb of

BTV genome segment 1 [VP1] (primers *forward*: 5'-3': GCG AAG TGT GGA CAT GAA GC, e *reverse* 5'-3': TCC TGC GGT ACG TAA CAA CC). The PCR reaction was performed, using 100ng of cDNA, 0,4µM of each primer, 1,5mM of MgCl₂, 10mM of dNTPs, 10% of buffered, and 1U of Taq DNA polymerase (Thermofisher Scientific, Life Technologies, Waltham, MA USA) under the following conditions: 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of 95°C for 45 sec, 59°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec; and a terminal extension of 7 minutes at 72°C. The PCR products were visualized in 2% agarose gel, stained with GelRed® gel (Biotium, CA, EUA), and analyzed under ultraviolet light. For all reactions a positive control (BTV amplified in BHK-21 cells) and a negative control (ultrapure water) were used. Serological tests were performed by agar gel immune diffusion using BTV as antigen and serum samples of cattle from farms where the outbreaks occurred as test samples. Serotype determination was kindly performed by Dra Zelia Lobato at the Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal of Federal University of Minas Gerais (UFMG).

RESULTS

Epidemiology

The 17 outbreaks occurred in farms from Central Region of RS, in the counties of Itaara (n=9), Santa Maria (n=3), São Pedro do Sul (n=1), Pinhal Grande (n=2) and Jaguari (n=2) (Fig. 1), between late spring/early summer (December 2014) until early winter (July 2015). According to information obtained from farmers, in all farms the vector was present in different amounts and identified as “pólvora” or “polvinha” (popular name of mosquitoes of the *Culicoides* genus). During the outbreaks, the farmers noticed larger amounts of these mosquitoes compared to the same period in previous years. In addition, favorable environmental conditions to the vector survival, such as dams and wetlands, were found in most farms.

In the 17 outbreaks, 884 sheep were at risk and 180 got sick (general morbidity rate of 20.4%) and 37 died (general mortality and lethality rates of 4.2% and 20.5%, respectively). All ages of Texel and mixed breed sheep were affected, however, lambs under one year-old had higher morbidity rate (28.8% [78/273]) than sheep with one year-old or more (16.7% [102/611]). Data for each farm, related to the number of sheep, age, and morbidity, mortality and lethality rates are specified in Table 1.

Clinical signs

The clinical course ranged from 3 to 7 days in sheep that died (average of five days) and around 10 days in sheep that recovered. Clinical signs observed in 100% of the outbreaks included anorexia, lethargy, loss of condition, facial swelling, mainly involving the lips, and greenish seromucous or mucous nasal discharge (Fig. 2) with crusting around the nares. Other frequent clinical signs (65% [11/17]) included respiratory distress, tachypnea, cough, pulmonary rattle, hyperemic or cyanotic oral mucosa, and ulcerative lesions in the oral cavity, mainly involving the hard palate. Eventually (three outbreaks), the sheep had swollen and cyanotic tongue. Less common clinical signs (35% [6/17]) included fever, salivation, food regurgitation, and stiffness with or without lameness. In many farms, the veterinarians responsible for the animal care, recommended the administration of broad-spectrum antibiotics, associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, once a day for 3-5 days.

Gross lesions

Greenish seromucous or mucous nasal discharge in varying amounts and pulmonary involvement were frequent (88% of necropsied sheep [15/17]). The lung lesions included pulmonary edema, characterized by an increased, not collapsed, heavy, reddened and shiny lung, with the rib impressions. Varied amounts of liquid and foam were observed in the trachea and large bronchi (Fig. 3) and, in six sheep, food also was present (Fig. 4). Many of these sheep had cranioventral pulmonary consolidation with increased consistency and redness of the cranial lobes (Fig. 5).

Lesions in the oral cavity were common (60% of necropsied sheep [10/17]), and included lips swelling, sometimes with hemorrhagic and ulcerative areas, and ulcers on the hard palate, mainly involving the *pulvinus dentalis* (Fig. 6), and hemorrhage and rounding of oral conic buds. The tongue, in three sheep, was swollen and cyanotic. Hemorrhagic and ulcerative areas in the dorsal surface of the tongue were common. Cardiovascular lesions were also frequent and were characterized by epicardial and endocardial hemorrhages. The endocardial hemorrhagic areas commonly involved the left ventricle, near insertion of the chordae tendineae, in the papillary muscle (Fig. 7). Hemorrhages in the mitral valve and in the base of pulmonary artery were seldom observed (Fig. 8a e 8b). Hydropericardium was observed in only two sheep.

Lesions involving other portions of the digestive tract were commonly seen in the rumen, and less frequently in the esophagus, reticulum, omasum and abomasum. Ruminal lesions were characterized by

hemorrhages in the mucosa, mainly affecting the pillars (Fig. 9), and ulcers in the apex of the papillae. Similar lesions were seen in the reticulum and omasum in two sheep. In three sheep, the esophagus was dilated and with hemorrhagic areas in the adventitia. The lesions in the abomasum were associated with parasitism by *Haemonchus contortus* in four sheep.

Lymph nodes, mainly the mesenteric and mediastinal were occasionally enlarged. Gross lesions in the skeletal muscle were rare, seen in one sheep, and characterized by muscle fibers alternating pale areas with hemorrhagic areas. In the same sheep, the urinary bladder was distended and with the wall markedly hemorrhagic. The severity of the gross lesions of each sheep is described in Table 2.

Histological lesions

The lesions in the lung, esophageal striated muscle, and cardiac and skeletal muscle, mainly in the neck and forelimbs, were the most frequent. The pulmonary lesion was characterized by the presence of hyaline material within the alveoli, bronchioles and bronchi (edema). This lesion was commonly associated with fibrinosuppurative bronchopneumonia, with alveoli, bronchioles and bronchi filled by intact and degenerate neutrophils and fibrin, and, not infrequently, by vegetable fibers (Fig. 10) and intralesional bacterial aggregates. Occasionally, large areas of pulmonary parenchymal necrosis were seen in severe cases, and, commonly, the interlobular septa were mildly thickened and the capillaries of alveolar septa were congested.

In esophageal striated muscles there was hyaline and flocculate degeneration and necrosis, characterized, respectively, by rounded and hypereosinophilic muscle fibers with pyknotic nuclei or fragmented fibers. There was inflammatory infiltrate predominantly lymphohistiocytic dissecting the muscle fibers or forming aggregates around of necrotic fibers. Also, multifocal areas of hemorrhage and mineralization of necrotic fibers were observed (Fig. 11), which were occasionally surrounded by multinucleated giant cells. Identical lesions were also observed in the skeletal muscles (Fig. 12), tongue and heart. However, hemorrhagic areas in the heart were more extensive, affecting mainly the myocardium (Fig. 13), extending to the endocardium and epicardium. There was transmural hemorrhage affecting the base of pulmonary artery. All of these tissues had endothelial hypertrophy of blood vessels, and, in some cases, fibrinoid vascular necrosis in the heart (Fig. 14), esophagus, lungs and tongue.

Other common lesions were associated with the oral cavity, involving mainly the lips, hard palate, oral conic buds, and tongue. On the lips, in both hairy and hairless portions, there were subcutaneous edema and perivascular aggregates of lymphocytes and macrophages, as well as hemorrhagic areas. Rumen and reticulum have erosion and ulceration of the lining epithelium. Ulcers and erosions were covered by fibrin, intact and degenerate neutrophils, erythrocytes, and cell debris (Fig. 15) and, commonly, showed vacuolar degeneration of adjacent epithelial cells. Hemorrhagic areas and lymphohistiocytic and neutrophilic perivascular inflammatory infiltrate were common in the dermis/lamina propria. In these tissues, endothelial swelling of blood vessels was also frequent.

Lesions in the lymph nodes and spleen were common and characterized by lymphoid nodular hyperplasia. Other less frequent changes were observed in the kidneys, liver, urinary bladder and intestine and were characterized, respectively, by multifocal tubular necrosis, centrilobular and paracentral hepatic necrosis, necrohemorrhagic cystitis, and lymphocytic and eosinophilic enteritis. The severity of the histological lesions of each sheep is described in the Table 3.

Virological findings

Samples of blood, spleen and lungs from several sheep from different outbreaks were positive to BTV by RT-PCR (Table 4). The BTV serotype 17 was isolated from spleen from outbreak 3. Among the 20 serum samples collected from contact cattle in the outbreaks, 17 were positive for BTV antibodies.

DISCUSSION

Similarly to other authors (Clavijo et al. 2002, Navarre et al. 2002, Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007, Antoniassi et al. 2010, Alfieri et al. 2012, Balaro et al. 2014, Lima et al. 2014), the diagnosis of BT in these outbreaks was based on clinical, pathological and epidemiological findings, and confirmed by detection of BTV RNA by RT-PCR. Epidemiologically, factors related to the virus, the vector, the environment and the host may influence the occurrence and severity of the outbreaks (Gibbs & Greiner 1994, Maclachlan 1994, Radostits et al. 2007, Williamson et al. 2008, Alfieri et al. 2012). Viruses of the BT serogroup are characterized by a remarkable genetic diversity (Maclachlan 1994), with differences in virulence between serotypes and viral strains (Radostits et al. 2007). Furthermore, due to the fact that the disease is not contagious, the insect vector is fundamental to the transmission and survival of the virus, and the BTV infection only occurs when competent vectors are present (Maclachlan 1994, Radostits et al. 2007). Based on information from the farmers, the vector was present in all farms where the outbreaks occurred.

The weather conditions are a major risk factor for the occurrence of BT (Radostits et al. 2007, Gould & Higgs 2009). Vector-borne diseases are highly sensitive to changes in weather and climate and can affect the geographical distribution and incidence of them (Medlock & Leach 2015). BT clearly occurs in areas with conditions that favor the proliferation of the insect vectors. These include hot climate areas, with high humidity, and a desirable environment for the development of mosquito larvae, such as stagnant water with organic matter (Maclachlan 1994, Radostits et al. 2007). Warm and rainy seasons favor the appearance of *Culicoides* and therefore the transmission of the virus (Barnard et al. 1998, Alfieri et al. 2012). Thus, in temperate zones, also called epidemic areas, the outbreaks are often seasonal. The disease is usually seen during the summer and early autumn and outbreaks cease after the first frost of winter (Gibbs & Greiner 1994, Maclachlan 1994, Riet-Correa 2007, Maclachlan 2011). This has been observed in the outbreaks described herein, which occurred during the summer until early winter. In addition, environmental factors favorable to the vector, such as rainy and hot spring and summer, and less cold winter, were observed in the RS in the years 2014 and 2015 (Centro Estadual de Meteorologia [CEMETRS] [2015]). The RS has the lowest prevalence of the disease in Brazil (Costa et al. 2006), probably due to the weather, which does not favor the survival of the vector during all year. However, the State is shown as an area of risk for occurrence of the disease. It has a large number of susceptible sheep and climate changes favorable to the vector have recently occurred, such as an increased of both, average annual precipitation and minimum temperatures (Costa et al. 2006, Alfieri et al. 2012).

Host factors that influence the severity of the disease included immune and nutritional status, stress, exposure to ultraviolet radiation, breed, and age (Gibbs & Greiner 1994, Maclachlan 1994, Radostits et al. 2007, Maclachlan et al. 2009). Breeds of sheep, which have arisen in cold or temperate climates are more susceptible to infection and disease. On the other hand, indigenous breeds to the tropics are susceptible to infection but do not develop disease (Gibbs & Greiner 1994, Maclachlan 1994). In these outbreaks, Texel and mixed breed sheep were affected. These authors also consider that sheep older than 3-4 years are most affect by BT. However, we observed that lambs under one year of age had higher morbidity rate (28.8%) than sheep with one year of age or more (16.7%). In addition, factors such as intensive management, low nutritional scores, and severe endoparasitism (*Haemonchus contortus*) may have contributed to the infections and clinical disease in some farms. These factors can weaken the sheep immune system, impairing an adequate immune response against the virus.

The perpetuation of BTV also depends on herds of other ruminants susceptible to the virus (Maclachlan 1994). Outbreaks may occur when susceptible ruminants or an exotic strain are introduced into endemic areas to BT; or when the virus spreads into immunologically naive sheep populations located at the interface of BTV endemic and non-endemic regions, through the introduction of a viremic ruminant or by the movements of winds bringing *Culicoides* infected with BTV (Gibbs & Greiner 1994, Maclachlan 1994, Radostits et al. 2007, Williamson et al. 2008, Wilson & Mellor 2008, Maclachlan et al. 2009). In the outbreaks here described, the origin of the virus could not be determined.

The morbidity and mortality rates can vary significantly among outbreaks (Maclachlan et al. 2009). When the disease occurs for the first time in a herd, the morbidity may reach to 50-75% and the mortality 20-50% (Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007). However, typically the mortality rate rarely exceeds 30% (Maclachlan et al. 2009), and remains in 1-10% (Guedes et al. 2010). In the reported outbreaks there was a wide variation in the morbidity, mortality and lethality rates, similar to reported in the literature.

The clinical manifestations are seen almost exclusively in sheep and rarely in cattle, which act as reservoir of the virus (Maclachlan 1990, Gibbs & Greiner 1994, Barnard et al. 1998, Maclachlan et al. 2009, Alfieri et al. 2012). The presence of BTV antibodies in 17 out of 20 samples from contact cattle indicated previous infection of these animals, without noticeable clinical signs. Although the pathogenesis of the disease in sheep and cattle is similar, it remains unclear why BTV causes disease in sheep but not in cattle (Maclachlan et al. 2009).

The clinical signs and the duration of clinical manifestations observed in these outbreaks were similar to those described by several authors (Clavijo et al. 2002, Navarre et al. 2002, Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007, Elbers et al. 2008, Williamson et al. 2008, Maclachlan et al. 2009, Antoniassi et al. 2010, Guedes et al. 2010, Alfieri et al. 2012, Balaro et al. 2014, Lima et al. 2014). Fever was described in less than half of the outbreaks. Clinical signs such as anorexia, lethargy, severe weight loss, facial swelling (mainly involving the lips), and greenish seromucous or mucous nasal discharge, seen in all outbreaks, were fundamental to the suspicion of BT in the absence of more characteristic clinical signs, such as ulcerative lesions in the oral cavity.

The gross and histological lesions observed in these outbreaks were also similar to those described by several authors (Clavijo et al. 2002, Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007, Williamson et al. 2008, Maclachlan et al. 2009, Antoniassi et al. 2010, Guedes et al. 2010, Alfieri et al. 2012, Balaro et al.

2014). The virus replicates in endothelial cells of capillaries and small blood vessels, causing degenerate, necrotic, and hyperplastic changes in the endothelium, which result in increased vascular permeability and causing edema, congestion, hemorrhage, thrombosis and necrosis (Radostits et al. 2007, Williamson et al. 2008, Maclachlan et al. 2009). Furthermore, the virus indirectly induces the release of vasoactive and inflammatory mediators by host cells, mainly platelets, macrophages, dendritic and endothelial cells. This contributes to a worsening of endothelial dysfunction and vascular damage (Maclachlan et al. 2009).

Histological lesions generally reflect the gross changes (Maclachlan et al. 2009). This aspect was observed in these outbreaks, however, there was divergence between esophageal and skeletal muscle lesions. Gross lesions in the esophagus were observed in three cases, and in skeletal muscle in only one. However, histological changes, characterized by degeneration and necrosis of myofibers, were present in almost all cases.

Pulmonary edema was a very important lesion observed in almost all necropsied sheep. This is a characteristic lesion of fulminant BT (Maclachlan et al. 2009) and it was probably the main cause of death. Many sheep also had aspirative pneumonia as a result of aspiration of regurgitated food content. This change occurs by paralysis of the esophagus due to muscle lesion induced by the virus (Radostits et al. 2007).

Cardiac hemorrhages and necrosis also were frequent, mainly seen on the left ventricle endocardium and papillary muscle. The papillary muscle of the left ventricle is considered as a characteristic location for the occurrence of this lesion (Maclachlan et al. 2009). Hemorrhage at the base of the pulmonary artery, considered a particular finding of BT, is described as an infrequent lesion (Antoniassi et al. 2010, Guedes et al. 2010, Alfieri et al. 2012, Lima et al. 2014), but it was observed in about half of the necropsied sheep. Erosive and ulcerative lesions in the upper digestive tract also are characteristic of BT and affect mainly the oral cavity, esophagus and forestomachs (Maclachlan et al. 2009). These characteristic changes were common in the outbreaks here described, and were helpful to suspect of the disease.

The diagnosis of BT was confirmed by RT-PCR assay using blood and tissues (spleen and lung) samples. These are the most important targets for BTV detection due to its tropism and pathogenesis (Maclachlan et al. 2009, Maclachlan 2011). The BTV serotype 17 was identified in samples collected from the outbreaks. This is the first report of this BTV serotype in Brazil. In addition, the large number of cattle with BTV antibodies (n=17) among the tested serum samples (n=20) indicate the exposure of animals to the virus.

The differential diagnosis for BT should be done with other diseases causing edema, hemorrhage, and epithelial damage (Williamson et al. 2008). In sheep it should include mainly contagious ecthyma, foot-and-mouth disease, and vesicular stomatitis (Riet-Correa 2007, Williamson et al. 2008, Alfieri et al. 2012). Furthermore, lesions such as muscle necrosis associated with mineralization may resemble nutritional muscle dystrophy (NMD), caused by deficiency of vitamin E and selenium. However, NMD is characterized by white areas in large muscle groups with chalk powder appearance in the muscle surface (Antoniassi et al. 2010).

Supportive treatment is the only option. Broad-spectrum antibiotics are indicated to avoid secondary bacterial infections. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are also indicated for controlling inflammation, fever, and pain. Nutritional and fluid support may be needed if the affected animals cannot eat or drink (Navarre et al. 2002). In many farms, the veterinarians responsible for the animal care, recommended the administration of broad-spectrum antibiotics, associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, once a day for 3-5 days. This treatment is very important in cases that sheep develop aspirative pneumonia.

Control of BTV infection is complicated by the plurality of virus serotypes and the ubiquity and feeding behavior of its midge vector (Maclachlan & Mayo 2013). Furthermore, as BTV infection can occur without clinical manifestations, particularly in cattle, the infection can spread unnoticed. Thus, the measures that can be adopted are aimed at minimizing the damage caused by the clinical disease (Alfieri et al. 2012). Control can be done by reducing the vector population using insecticides, although this technique has been shown to be impractical for routine use and may result in environmental problems, besides being very expensive and economically unviable. Restrictive measures for the ruminant introduction in the farms should also be adopted. Such animals must be kept in quarantine and have animal health certificate with negative results for viral isolation or PCR assay from blood samples (Radostits et al. 2007, Alfieri et al. 2012, Maclachlan & Mayo 2013). Vaccination is a preventive measure most used in countries where BT is an important sanitary problem. However, in Brazil there are no licensed vaccines (Alfieri et al. 2012). Recovered animals are resistant to reinfection with homologous virus serotype, which is the basis for vaccination strategies to prevent BTV infection and the clinical disease (Maclachlan et al. 2014).

CONCLUSION

Our results support that the Central Region of RS should be considered an area at risk for BT in sheep and, thus, may deserve attention from veterinarians and official animal services.

Acknowledgements. – The authors would like to acknowledge Veterinarian Rodrigo Machado Leon, for his assistance in carrying out the clinical and epidemiological assessment of some outbreaks, and Dr. Zelia Ines Portela Lobato for the identification of BTV serotype. R.M.Bianchi, W.Panziera and J.F.Cargnelutti are research fellowship of CNPq, and T.C. Faccin is research fellowship of Capes.

REFERENCES

- Afshar A. 1994. Bluetongue: laboratory diagnosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17:221-242.
- Alfieri A.A., Alfieri A.F., Matos A.C.D., Lorenzetti E. & Lobato Z.I.P. 2012. *Reoviridae*, p.897-940. In: Flores E.F. (Org.). *Virologia Veterinária*. 2^a ed. Editora UFSM, Santa Maria. 1007p.
- Anthony S., Jones H., Darpel K.E., Elliott H., Maan S., Samuel A., Mellor P.S. & Mertens P.P.C. 2007. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *J. Virol. Methods.* 141:188-197.
- 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. *Pesq. Vet. Bras.* 30:1010-1016.
- Barnard B.J.H., Gerdes G.H. & Meiswinkel R. 1998. Some epidemiological and economic aspects of a bluetongue-like disease in cattle in South Africa – 1995/96 and 1997. *Onderstepoort J. Vet.* 65:145-151.
- Caporale M., Wash R., Pini A., Savini G., Franchi P., Golder M., Patterson-Kane J., Mertens P., Gialleonardo L.D., Armillotta G., Lelli R., Kellam P. & Palmarini M. 2011. Determinants of bluetongue virus virulence in murine models of disease. *J. Virol.* 85:11479-11489.
- CEMETRS. 2015. Boletins meteorológicos do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura Pecuária e Agronegócio, Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Available in: <http://www.cemet.rs.gov.br/lista/218/Boletim_Meteorol%C3%B3gico_Mensal>. Access on May 10, 2015.
- 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. *Vet. Rec.* 151:301-302.
- Costa J.R.R., Lobato Z.I.P., Herrmann G.P., Leite R.C. & Haddad J.P.A. 2006. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:273-275.
- Elbers A.R.W., Backx A., Meroc E., Gerbier G., Staubach C., Hendrickx G, Spek A. & Mintiens K. 2008. Field observations during de bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87:21-30.
- Gibbs E.P. & Greiner E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17:207-220.
- Gould E.A. & Higgs S. 2009. Impact of climate and other factors on emerging arbovirus diseases. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103:109-121.
- Grocock C.M. & Campbell C.H. 1982. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.* 46:160-164.
- Guedes R.M.C., Brown C.C. & Sequeira J.L. 2010. Sistema digestório, p.89-182. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), *Patologia Veterinária*. Roca, São Paulo. 892p.
- Guimarães L.L.B. 2015. Achados clínicos e patológicos de sete surtos de língua azul em ovinos em 2014 no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre. 63p.
- Lager I.A. 2004. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet. Ital.* 40:89-93.
- Lima P.A., Utiumi K.U., Bihrer D.A., Albuquerque A.S., Souza B.M., Matos A.C.D., Varaschin M.S. & Raymundo D.L. 2014. Isolamento do sorotipo 4 do vírus da língua azul em um surto da doença em Minas Gerais. *Anais do VIII Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário (ENDIVET)*, Cuiabá, MT.
- 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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 38:69-74.

- Maan N.S., Maan S., Belaganahalli M.N., Ostlund E.N. Johnson D.J., Nomikou K. & Mertens P.P.C. 2012. Identification and differentiation of twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PloS One* 7:e32601.
- Maclachlan N.J., Jagels G., Rossitto P.V., Moore P.F. & Heidner H.W. 1990. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Vet. Pathol.* 27:223-229.
- Maclachlan N.J. 1994. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17:197-206.
- Maclachlan N.J., Drew C.P. Darpel K.E. & Worwa G. 2009. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Path.* 141:1-16.
- Maclachlan N.J. 2011. Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev. Vet. Med.* 102:107-111.
- 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. *Antiv. Res.* 99:79-90.
- Maclachlan N.J., Henderson C., Schwartz-Cornil I. & Zientara S. 2014. The immune response of ruminant livestock to bluetongue virus: from type I interferon to antibody. *Virus Res.* 182:71-77.
- MAPA. 2013. Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013. Diário Oficial da União. Available in: <www.agricultura.gov.br>. Access on April 19, 2015.
- Medlock J.M. & Leach S.A. 2015. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infect. Dis.* 15:1-10.
- Navarre C.B., Lowder M.Q. & Pugh D.G. 2002. Oral-esophageal diseases, p.61-68. In: Pugh D.G. (Ed.), *Sheep & goat medicine*. Saunders, Philadelphia. 468p.
- OIE. 2015. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Available in: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015>>. Access on April 19, 2015.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases associated with viruses and Chlamydia - I, p.1157-1305. In: *Ibid* (Eds.), *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2156p.
- Riet-Correa F. 2007. Língua azul, p.169-173. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds), *Doenças de ruminantes e equídeos*. Vol. 1. 3^a ed. Pallotti, Santa Maria. 719p.
- Williamson S., Woodger N. & Darpel K. 2008. Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. In *Practice*. 30:242-251.
- Wilson A. & Mellor P. 2008. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol. Res.* 103:69-77.

Table 1. Population and age of the sheep at risk, and morbidity, mortality, and lethality rates of bluetongue outbreaks.

Outbreak and city	Total number of sheep	Age of sickened sheep	Morbidity (%)	Mortality (%)	Lethality (%)
(O1) Itaara, RS	80 (29 ^a + 5 ^b)	10 (3 ^a + 7 ^b)	12,5 (10/80)	2,5 (2/80)	20 (2/10)
(O2) Santa Maria, RS	197 (40 + 157)	31 (9 + 22)	15,7 (31/197)	5,6 (11/197)	35,5 (11/31)
(O3) Itaara, RS	11 (5 + 6)	7 (3 + 4)	63,6 (7/11)	9,1 (1/11)	14,3 (1/7)
(O4) Itaara, RS	40 (19 + 21)	2 (0 + 2)	5 (2/40)	2,5 (1/40)	50 (1/2)
(O5) Itaara, RS	41 (17 + 24)	17 (6 + 11)	41,5 (17/41)	0 (0/41)	0 (0/0)
(O6) Itaara, RS	19 (6 + 13)	1 (0 + 1)	5,3 (1/19)	5,3 (1/19)	100 (1/1)
(O7) Itaara, RS	28 (15 + 13)	4 (1 + 3)	14,3 (4/28)	7,14 (2/28)	50 (2/4)
(O8) Santa Maria, RS	24 (0 + 24)	3 (0 + 3)	12,5 (3/24)	4,2 (1/24)	33,3 (1/3)
(O9) Itaara, RS	51 (12 + 39)	3 (2 + 1)	5,9 (3/51)	3,9 (2/51)	66,7 (2/3)
(O10) Itaara, RS	11 (2 + 9)	3 (2 + 1)	27,3 (3/11)	0 (0/11)	0 (0/0)
(O11) São Pedro do Sul, RS	121 (38 + 83)	55 (20 + 35)	45,4 (55/121)	1,6 (2/121)	3,6 (2/55)
(O12) Pinhal Grande, RS	19 (14 + 5)	10 (8 + 2)	52,6 (10/19)	15,8 (3/19)	30 (3/10)
(O13) Pinhal Grande, RS	40 (13 + 27)	1 (0 + 1)	2,5 (1/40)	0 (0/0)	0 (0/0)
(O14) Itaara, RS	28 (8 + 20)	8 (3 + 5)	28,6 (8/28)	0 (0/0)	0 (0/0)
(O15) Santa Maria, RS	124 (30 + 94)	12 (12 + 0)	9,7 (12/124)	1,6 (2/124)	16,7 (2/12)
(O16) Jaguari, RS	15 (5 + 10)	8 (4 + 4)	53,3 (8/15)	46,7 (7/15)	87,5 (7/8)
(O17) Jaguari, RS	35 (19 + 16)	5 (5 + 0)	14,3 (5/35)	11,4 (4/35)	80 (4/5)
Total or average	884 (273 + 611)	180 (78 + 102)	24,1 (2,5-63,6)	7 (0-46,7)	34,5 (0-100)

O: Outbreak.

^a Number of lambs under one year of age.

^b Number of sheep with one year of age or more.

Table 2. Distribution, and severity of gross lesions.

	Sheep	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17
Organs																		
Lips	-	-	+	+	+++	+	++	+	+	+	+	++	++	++	++	+	++	-
Hard palate	-	-	-	-	+++	-	+++	++	+	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
Tongue	-	-	++	++	++	+	++	+	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-
Cheeks	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Rumen	-	-	-	-	+++	-	++	++	++	++	-	+++	-	-	-	-	-	+++
Reticulum	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Omasum	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abomasum	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
Intestine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	++	+	+++	+	+++	-	++	-	+++	+	+	+	+	+	-	+
Pulmonary artery	-	-	++	-	+++	+	+++	-	-	-	-	+++	+	-	+	+	-	-
Lung	+	+++	++	++	+++	+++	+++	-	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
Skeletal muscles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymph nodes	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidneys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no lesion; (+) mild lesion; (++) moderate lesion; (+++) severe lesion.

Table 3. Distribution, and severity of histological lesions.

Sheep	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	
Organs																		
Lips	NE	NE	NE	NE	++	NE	++	NE	+	NE	++	++	++	+	+	++	-	
Hard palate	NE	NE	NE	NE	+++	NE	+++	++	NE	NE	+++	-	-	-	-	-	-	
Tongue	NE	NE	+++	++	++	++	++	++	-	NE	++	+	-	-	++	-	-	
Cheeks	NE	NE	NE	NE	++	NE	++	NE	NE	NE	++	-	-	-	-	-	-	
Esophagus	NE	NE	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	++	+++	+++	++	+	+	+	
Rumen	NE	NE	-	-	+++	-	++	++	++	NE	+++	-	-	-	-	-	+++	
Reticulum	NE	NE	-	NE	++	-	-	+	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	
Omasum	NE	NE	-	NE	+	-	-	-	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	
Abomasum	NE	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	
Intestine	NE	NE	-	++	-	-	++	+	-	NE	-	-	-	+	-	-	-	
Heart	-	-	++	+	+++	++	+++	++	++	NE	+++	++	++	++	+	++	+	
Pulmonary artery	NE	NE	++	NE	+++	++	+++	+	-	NE	+++	+	-	+	+	-	-	
Lung	+	+++	++	++	++	+++	-	+	+	+	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	
Skeletal muscles	NE	NE	++	NE	++	+++	++	+++	+++	NE	+++	+	+	+	+	+	+	
Spleen	NE	NE	++	-	++	-	+	+	-	NE	+	-	-	-	-	-	-	
Lymph nodes	NE	NE	NE	-	++	++	++	++	+	NE	++	-	-	-	-	-	-	
Liver	-	++	-	-	-	-	-	-	++	NE	-	+	-	-	-	-	-	
Kidneys	+	-	-	-	-	-	+	-	-	NE	+	-	+	-	-	-	-	
Urinary bladder	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+++	-	-	-	-	-	-	
Brain	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	

(NE) not examined; (+) mild lesion; (++) moderate lesion; (+++) severe lesion.

Table 4. Sheep subjected to necropsy and type of sample sent to RT-PCR assay.

Outbreak	Necropsy	PCR of tissue	PCR of blood
1	Yes	+	UR
1	Yes	+	+
1	No	UR	+
2	Yes	UR	UR
2	Yes	UR	UR
2	Yes	UR	UR
2	Yes	UR	+
2	Yes	+	UR
2	Yes	UR	UR
2	No	UR	+
3	Yes	+	+
4	No	UR	+
5	No	UR	+
6	Yes	+	+
7	No	UR	+
8	No	UR	+
9	No	UR	+
10	No	UR	+
11	Yes	UR	UR
11	No	UR	+
12	Yes	+	UR
12	Yes	UR	UR
13	No	UR	+
14	No	UR	+
15	Yes	+	UR
16	Yes	+	UR
17	Yes	+	UR

(UR) unrealized; (+) positive result.

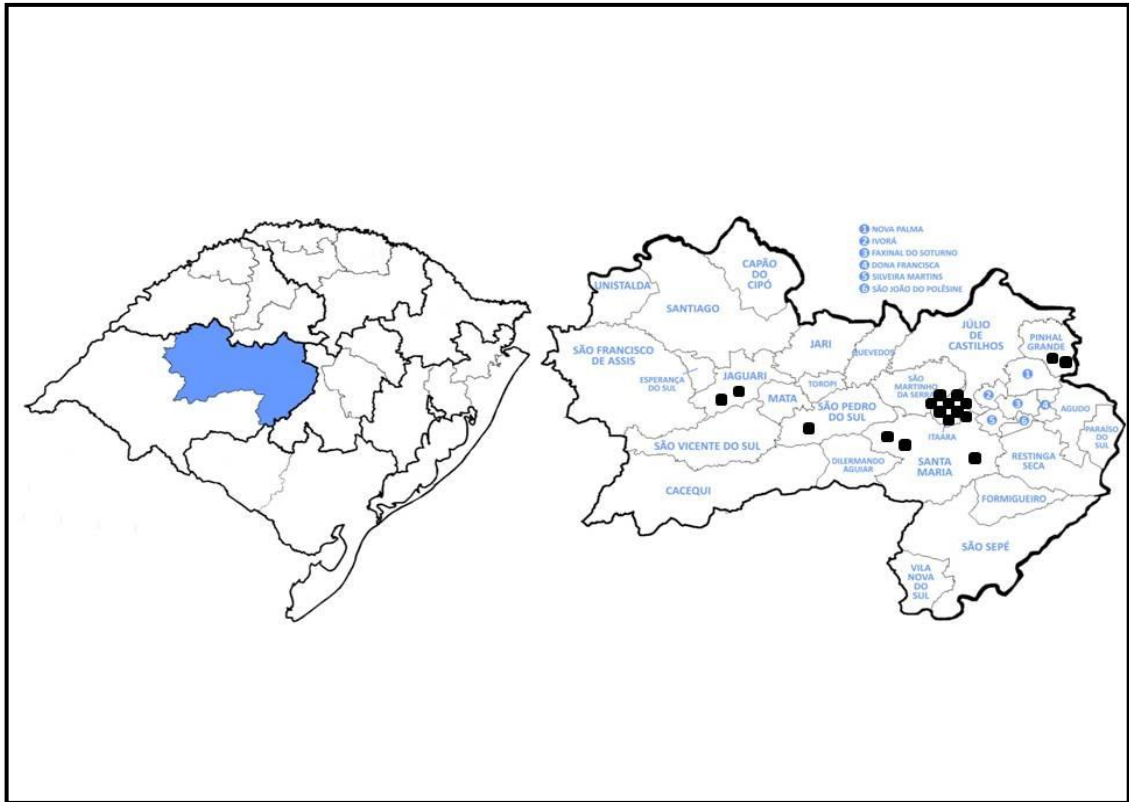


Fig. 1. Map of central region of Rio Grande do Sul, Brazil, showing the distribution of the outbreaks.



Fig. 2. Bluetongue, face, sheep. Abundant greenish mucous nasal discharge. Note the marked facial swelling, mainly on the upper lip.

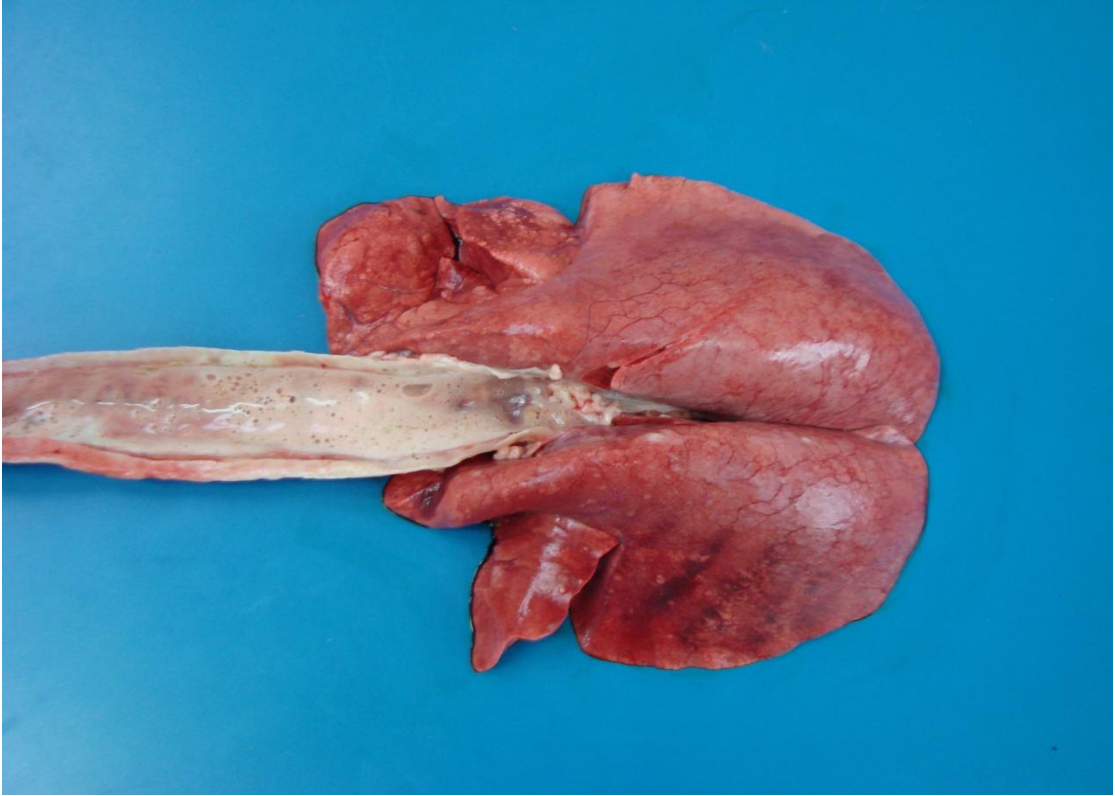


Fig. 3. Bluetongue, lung and trachea, sheep. Increased, not collapsed, heavy, reddened, and shiny lung, with the rib impressions. In the trachea there is moderate amount of foamy content (edema).



Fig. 4. Bluetongue, trachea and large bronchi, sheep. Mucous exsudate admixed with food fragments (aspirate material).

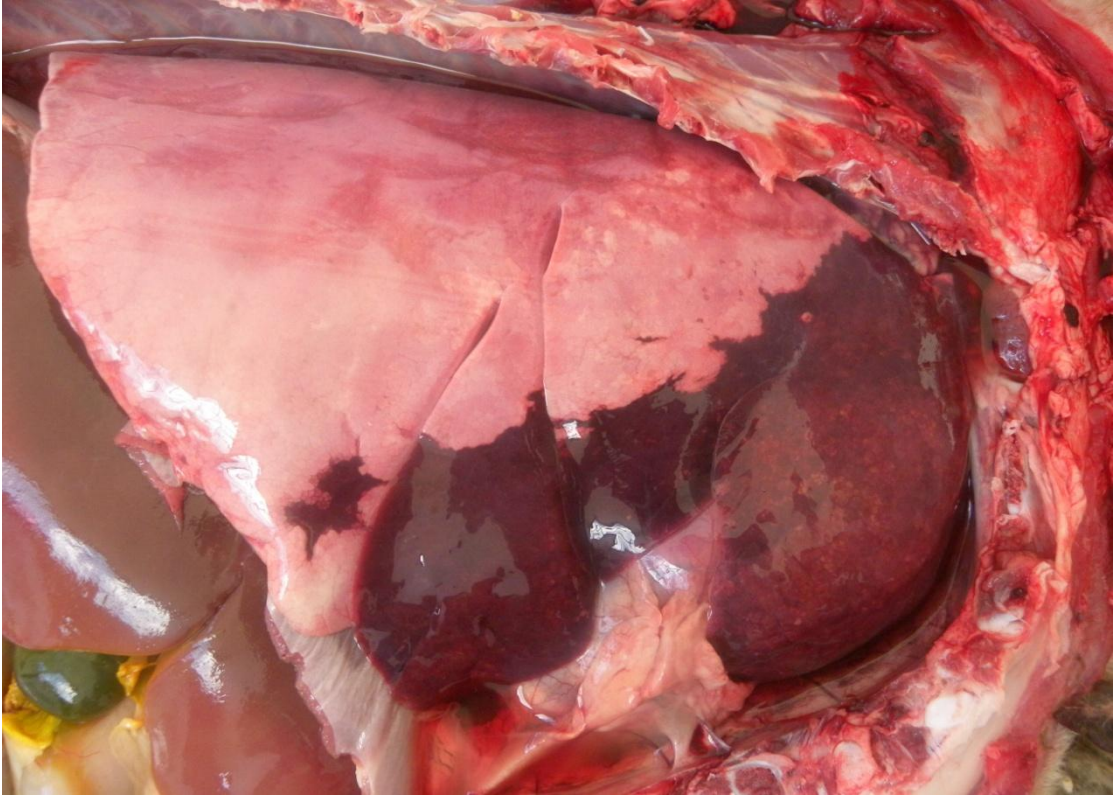


Fig. 5. Bluetongue, thoracic cavity, sheep. The right cranial, and middle lobes are markedly firm and reddened (cranioventral pulmonary consolidation).



Fig. 6. Bluetongue, oral cavity, sheep. Ulcerative and hemorrhagic areas on the upper lip, and hard palate, mainly involving pulvinus dentalis. Note that the lip is markedly thick.

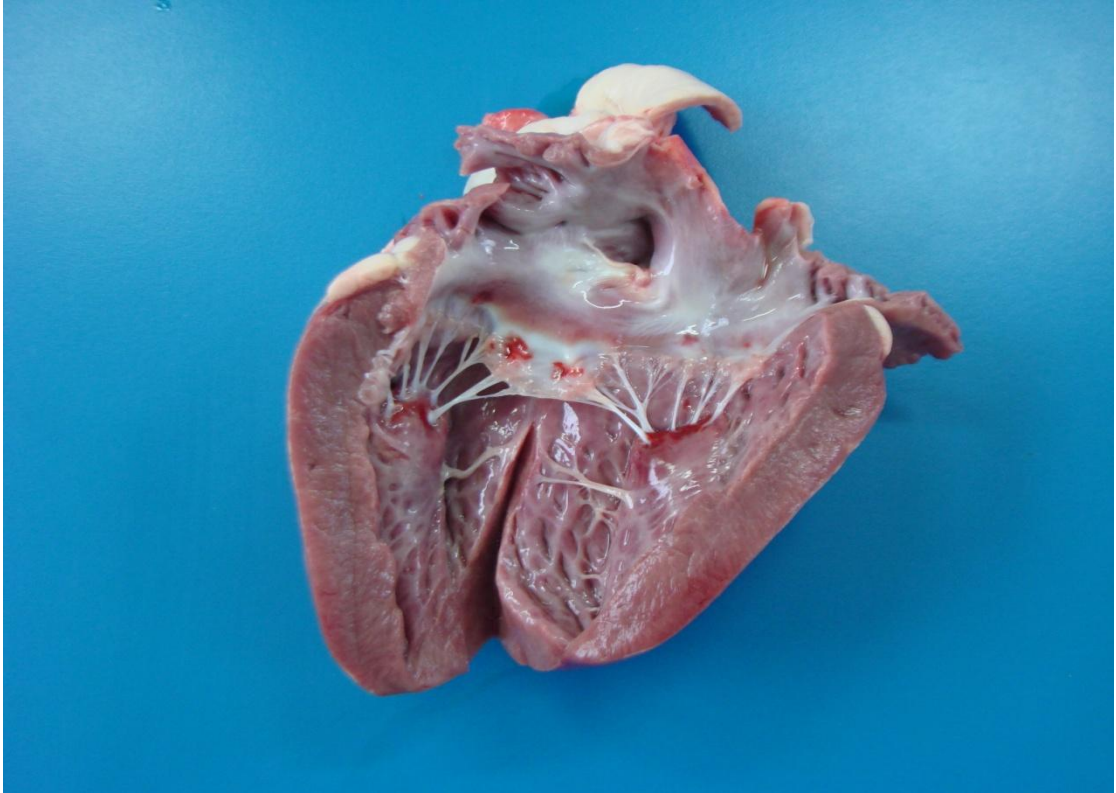


Fig. 7. Bluetongue, heart, sheep. Symmetrical bilaterall hemorrhage affecting papillary muscles.

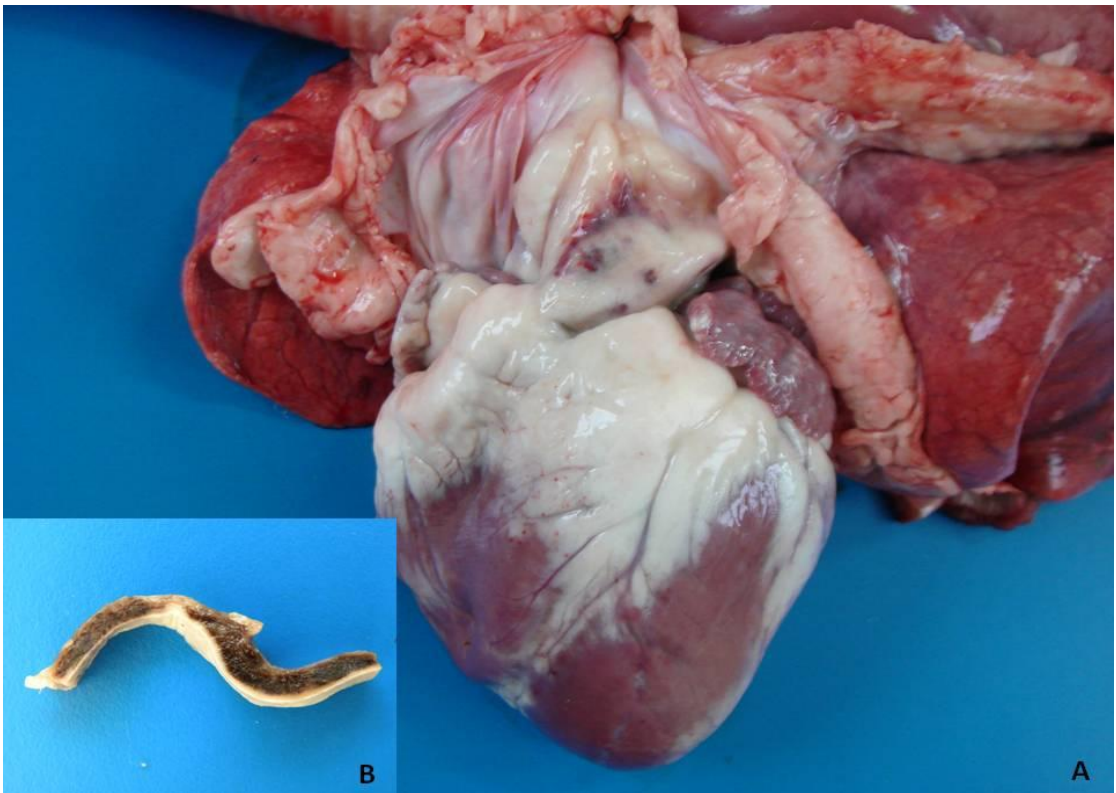


Fig. 8. Bluetongue, pulmonary artery, sheep. (A) Hemorrhages in the pulmonary artery. (B) Inset, cut surface with transmural hemorrhage.



Fig. 9. Bluetongue, rumen and reticulum, sheep. Multifocal hemorrhages on rumen pillars and reticulum mucosa.

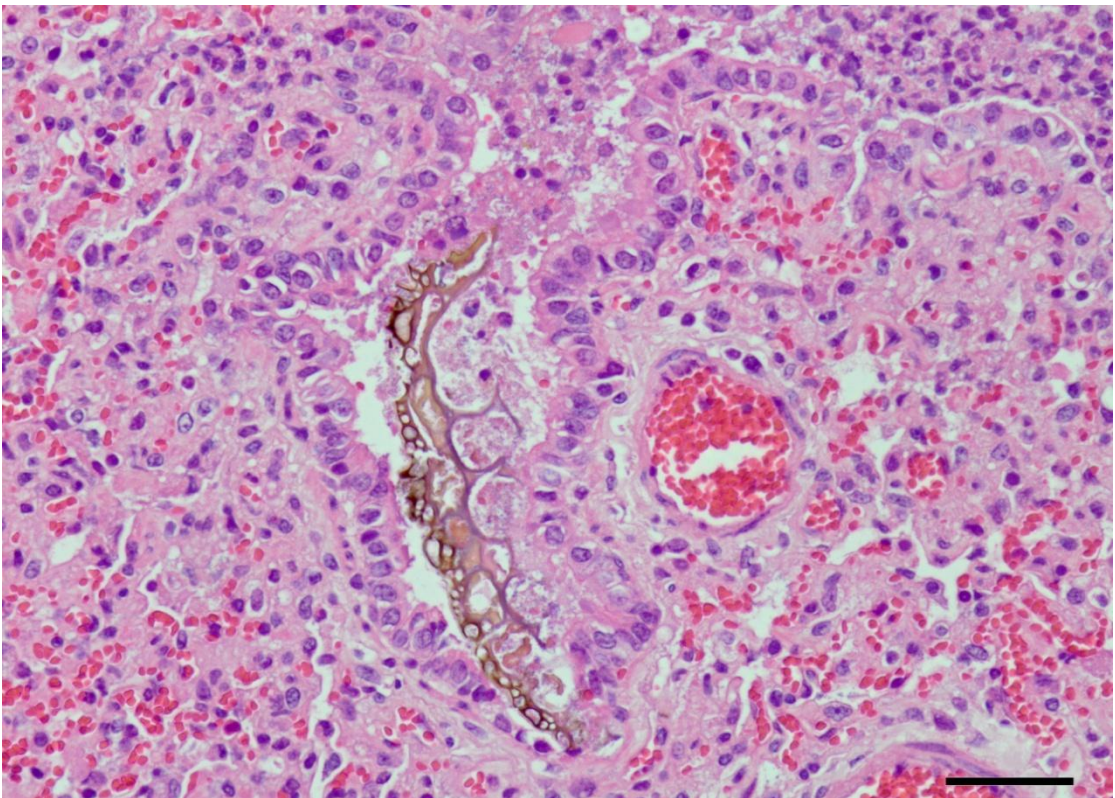


Fig. 10. Bluetongue, lung, sheep. Birrefringent, and greenish-brown material within a bronchiole (vegetable fiber). Note there are lots of fibrin, and intact and degenerate neutrophils around the fiber, and adjacent alveoli. HE, obj. 40x.

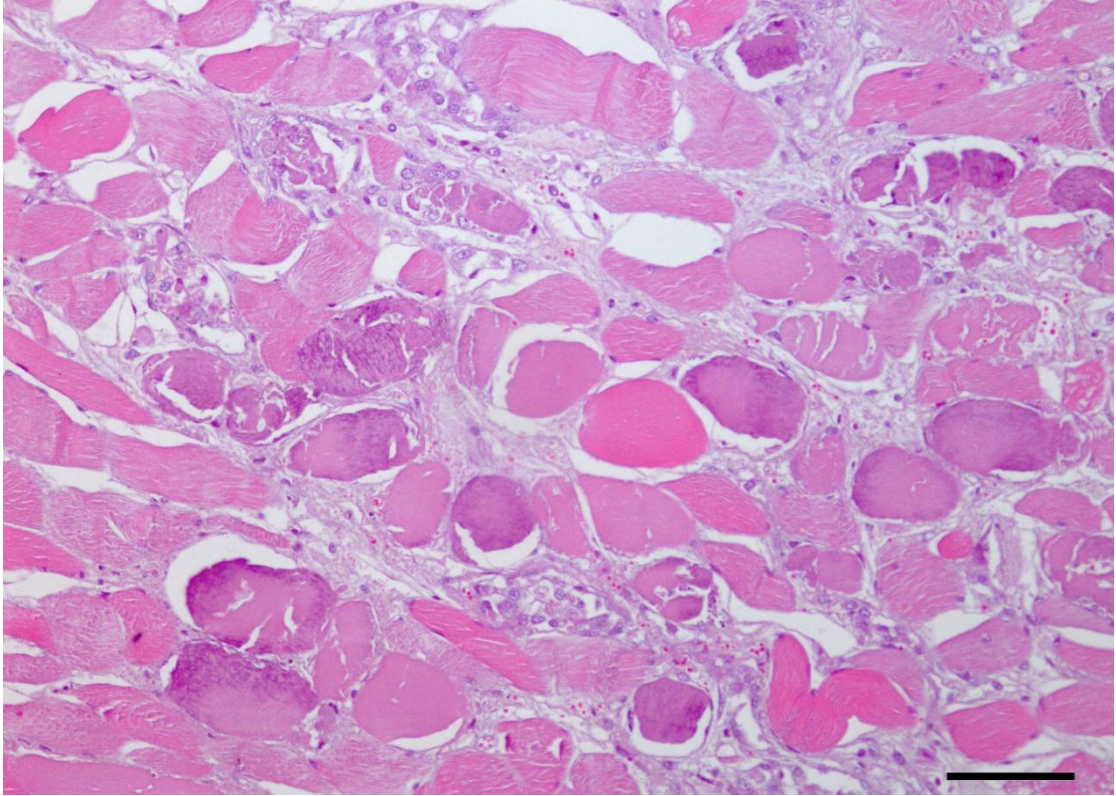


Fig. 11. Bluetongue, esophagus, sheep. Hyaline and floculate degeneration and necrosis of myofibers. Note there is mineralization of necrotic fibers, and some of them are surrounded by lymphocytes and macrophages. HE, obj. 20x.

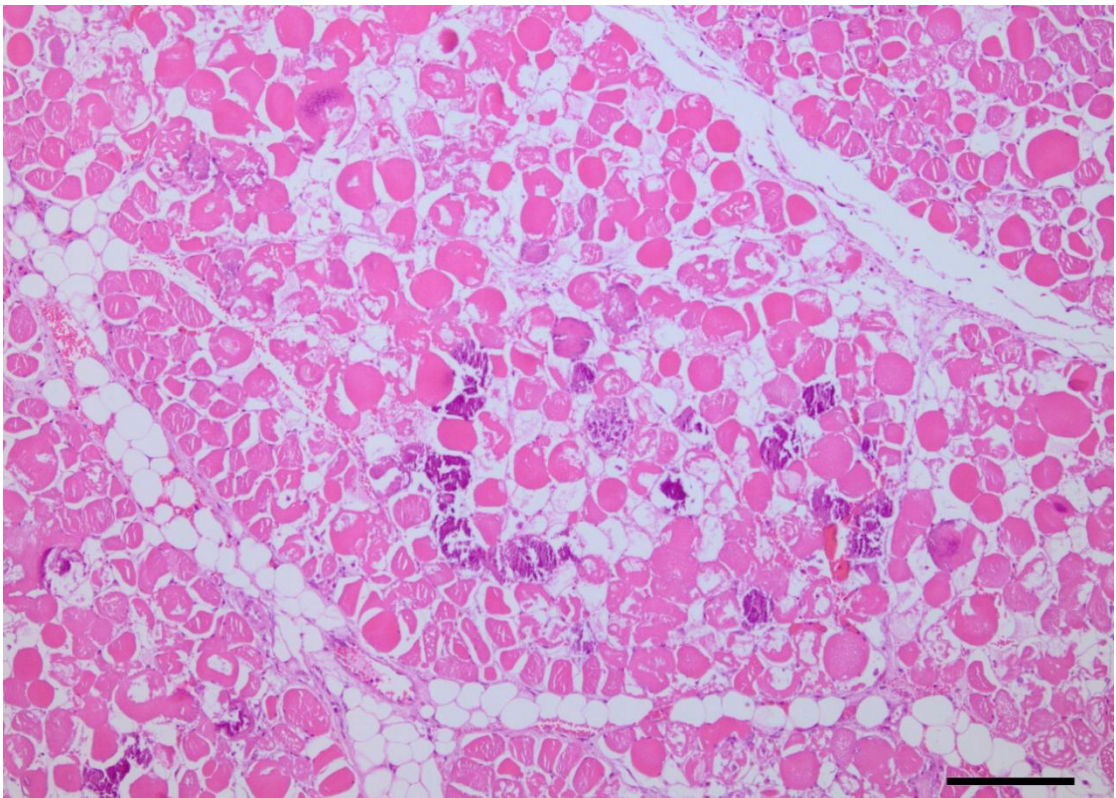


Fig. 12. Bluetongue, skeletal muscle, sheep. Hyaline and floculate degeneration and necrosis of myofibers with mineralization of necrotic fibers. HE, obj. 10x.

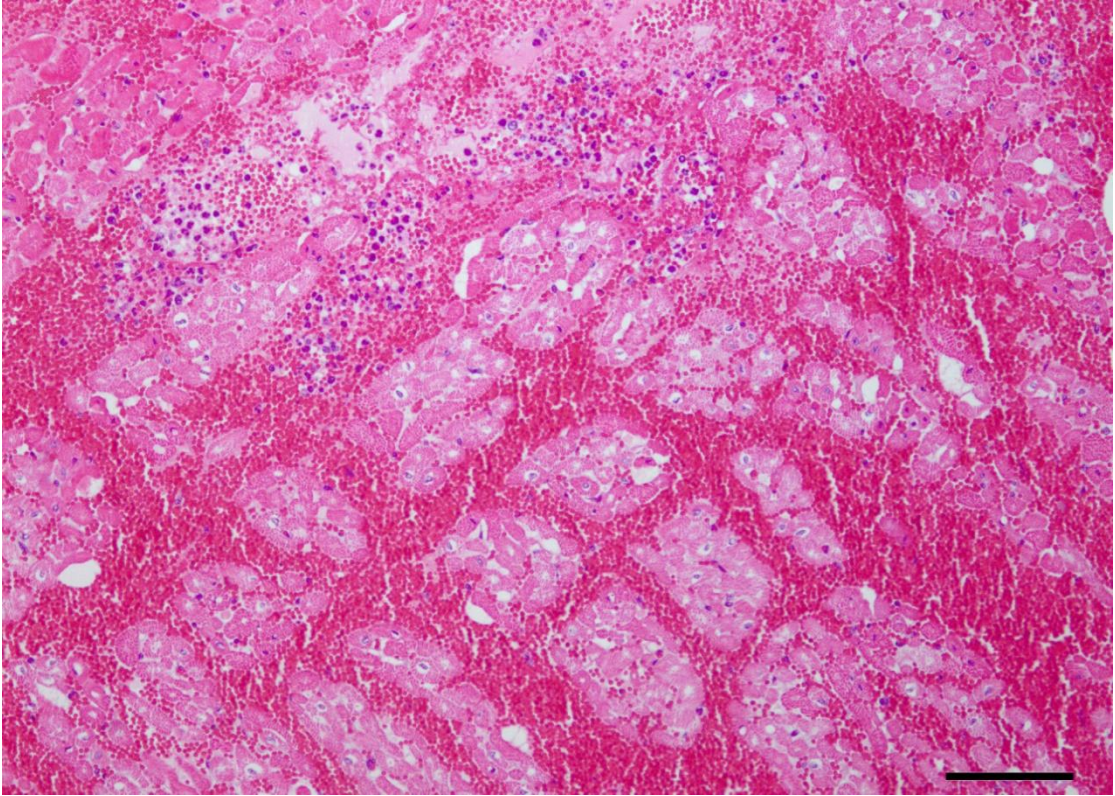


Fig. 13. Bluetongue, heart, sheep. Extensive hemorrhagic areas in the myocardium dissecting the muscle fibers. Note there is neutrophilic inflammatory infiltrate through the hemorrhage. HE, obj. 20x.

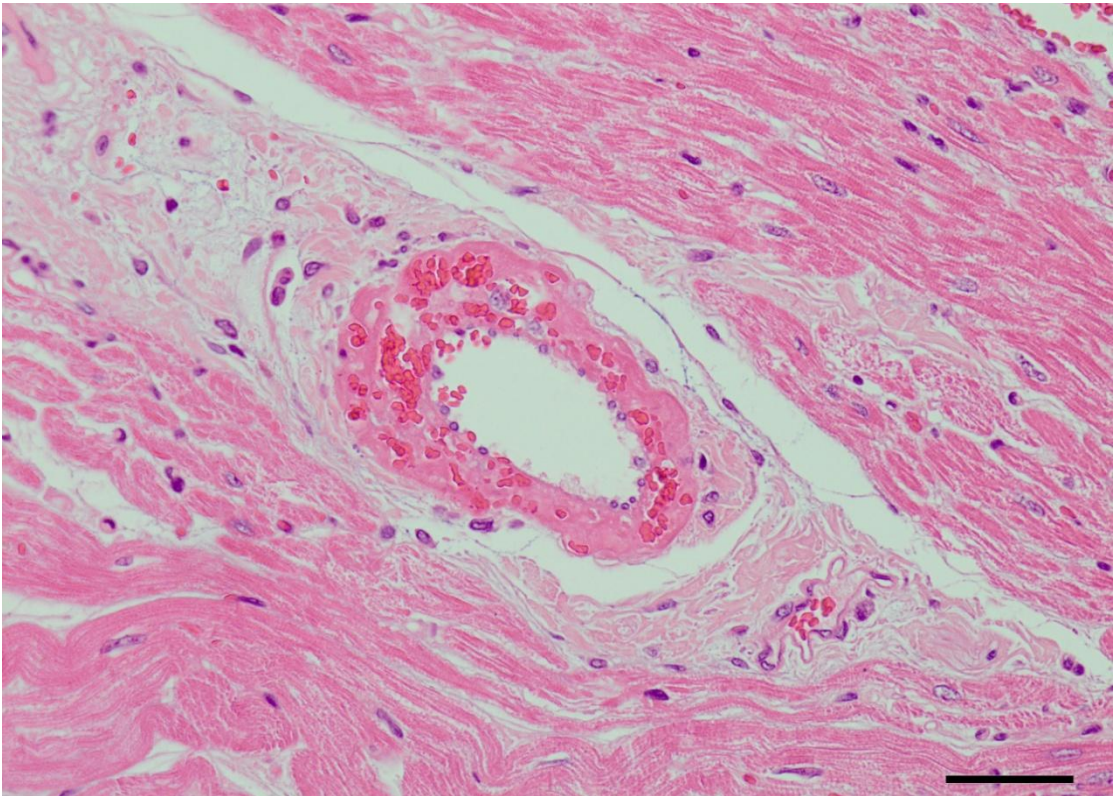


Fig. 14. Bluetongue, heart, and blood vessel, sheep. Marked hyalinization of the arteriole wall (fibrinoid vascular necrosis). HE, obj. 40x.

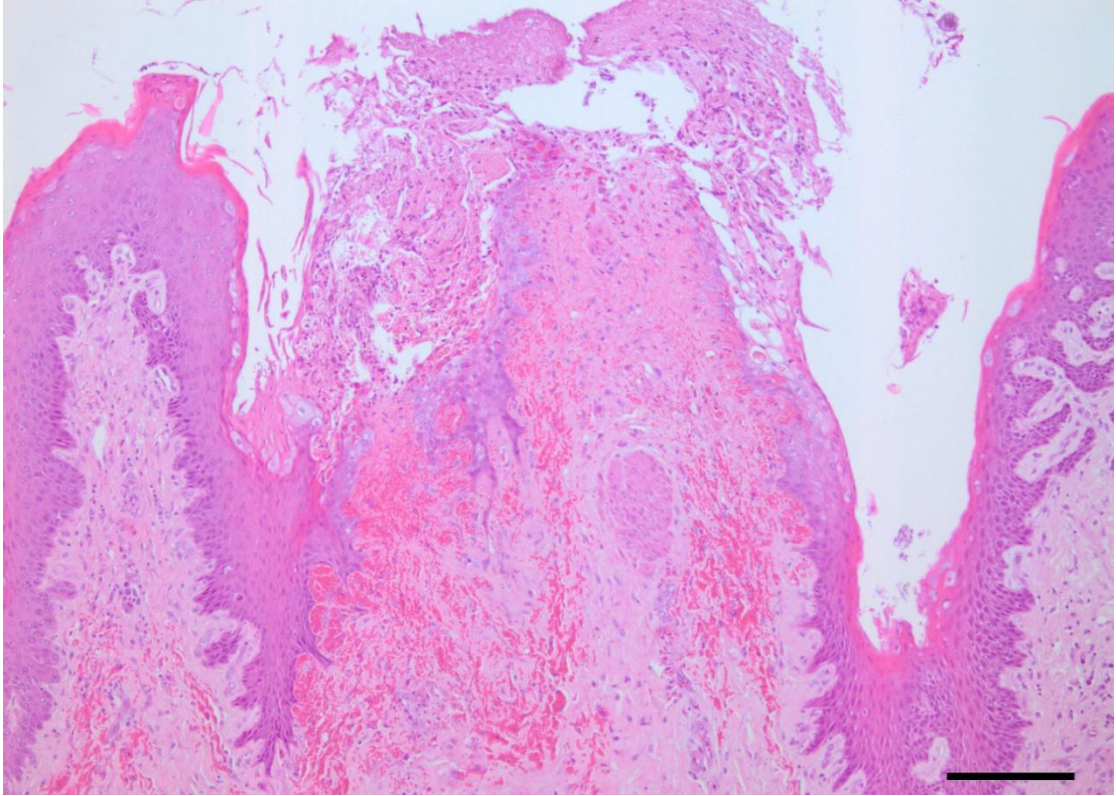


Fig. 15. Bluetongue, reticulum, sheep. Marked ulceration of lining epithelium. Note the ulcerated area is covered by fibrin, intact and degenerate neutrophils, erythrocytes, and cellular debris. There is also hemorrhage extending into the submucosa. HE, obj. 10x.

3. CONCLUSÕES

1. Os resultados apresentados permitem concluir que a Região Central do Rio Grande do Sul é uma área de ocorrência de língua azul em ovinos. Já que, durante grande parte do ano, há condições ambientais favoráveis à presença do vetor, além de grande número de animais suscetíveis à infecção.
2. Ovinos de todas as faixas etárias podem ser acometidos e os sinais clínicos mais frequentes caracterizam-se por anorexia, apatia, perda de peso, edema facial, envolvendo principalmente os lábios, e secreção nasal.
3. Lesões pulmonares caracterizadas por edema, assim como, necrose da musculatura cardíaca e esquelética e do músculo estriado do esôfago são as lesões mais prevalentes, porém, lesões erosivas e ulcerativas no trato gastrointestinal superior e hemorragia na artéria pulmonar também são comuns.
4. A associação dos achados epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos permite o diagnóstico presuntivo de língua azul em ovinos. O diagnóstico definitivo deve ser feito por meio de um exame virológico, o qual, a RT-PCR mostra-se como um método rápido, confiável e eficiente para confirmação do diagnóstico.
5. O sorotipo 17 do BTV foi identificado como o causador de um dos surtos relatados e, pela primeira vez, é descrito no Brasil.

4. REFERÊNCIAS

- AFSHAR, A. Bluetongue: laboratory diagnosis. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, p. 221-242, 1994.
- ALFIERI, A. A. et al. *Reoviridae*. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. cap. 31, p. 897-940.
- ANTHONY, S. et al. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 188-197, 2007.
- ANTONIASSI, N. A. B. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 1010-1016, 2010.
- BALARO, M. F. A. et al. Outbreak of bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, p. 567-570, 2014.
- BARNARD, B. J. H.; GERDES, G. H.; MEISWINKEL, R. Some epidemiological and economic aspects of a bluetongue-like disease in cattle in South Africa – 1995/96 and 1997. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 145-151, 1998.
- BARROS, C. S. L. Ectima contagioso. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v. 1, p. 98-102.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**. 2013. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 19 fev. 2015.
- BROWN, C. C.; BAKER, D. C.; BARKER, I. K. Alimentary System. In: MAXIE, M. G. (Ed). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. New York: Saunders Elsevier, 2007. v. 2, cap. 1, p. 0-296.
- CAPORALE, M. et al. Determinants of bluetongue virus virulence in murine models of disease. **Journal of Virology**, v. 85, p. 11479-11489, 2011.
- CLAVIJO, A. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **Veterinary Record**, v. 151, p. 301-302, 2002.
- COSTA, J. R. R. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 273-275, 2006.
- ELBERS, A. R. W. et al. Field observations during de 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.

GELBERG, H. B. Sistema alimentar, peritônio, omento, mesentério e cavidade peritoneal. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Eds.) **Bases da Patologia em Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 7, p. 324-406.

GIBBS, E. P.; GREINER, E. C. The epidemiology of bluetongue. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, p. 207-220, 1994.

GINN, P. E; MANSELL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Skyn and appendages. In: MAXIE, M. G. (Ed). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. New York: Saunders Elsevier, 2007. v. 1, cap. 5, p. 553-781.

GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate and other factors on emerging arbovirus diseases. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 109-121, 2009.

GROOCOCK, 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, p. 160-164, 1982.

GUEDES, R. M. C.; BROWN, C. C.; SEQUEIRA, J. L. Sistema digestório. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Eds). **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. cap 3. p. 89-182.

GUIMARÃES L.L.B. **Achados clínicos e patológicos de sete surtos de língua azul em ovinos em 2014 no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2015. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O tegumento. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Eds.) **Bases da Patologia em Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 17, p. 975-1087.

LAGER, I. A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v. 40, p. 89-93, 2004.

LIMA, P. A. et al. Isolamento do sorotipo 4 do vírus da língua azul em um surto da doença em Minas Gerais. **Anais do VIII Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário (ENDIVET)**, Cuiabá, MT, 2014.

LOBÃO, F. M. et al. Língua azul em ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 69-74, 2014.

MAAN, N. S. et al. Identification and differentiation of twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. **PLoS One**, v. 7, p. e32601, 2012.

MACLACHLAN, N. J. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 223-229, 1990.

MACLACHLAN, N. J. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, p. 197-206, 1994.

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

MACLACHLAN, N. J. Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 107-111, 2011.

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

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

MEDLOCK, J. M.; LEACH, S. A. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. **Lancet Infectious Diseases**, v. 15, p. 1-10, 2015.

NAVARRE, C. B.; LOWDER, M. Q.; PUGH, D. G. Oral-esophageal diseases. In: PUGH, D. G. (Ed.). **Sheep & goat medicine**. Philadelphia: Saunders, 2002. cap. 3, p. 61-68.

OSBURN, B. I. The impact of bluetongue virus on reproduction. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, p. 189-196, 1994.

PRADO, J. A.; RIET-CORREA, F. Febre aftosa. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds). **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v. 1, p.111-117.

RADOSTITS, O. M. et al. Diseases associated with viruses and Chlamydia - I. In: _____ (Eds.). **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10th ed. Philadelphia: Saunders, 2007. cap. 21, p.1157-1305.

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

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

WILSON, A.; MELLOR, P. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. **Parasitology Research**, v. 103, p. 69-77, 2008.

World Organisation for Animal Health (OIE). **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015**. 2015. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015>>. Acesso em: 19 fev. 2015.

ANEXO A - AMOSTRAS E EXAMES EM CASOS DE SUSPEITA DE LÍNGUA AZUL EM OVINOS

- Principais sinais clínicos:
 - Apatia, anorexia, emagrecimento, febre (queda da lã), edema na face (lábios), secreção nasal seromucosa ou muco-esverdeada, erosões e úlceras na cavidade oral.

- Amostras que podem ser coletadas no **animal vivo**:
 - Sangue total (tubos com anticoagulante [EDTA]);
 - ✓ Refrigerado e/ou congelado (-80°C).
 - Soro (tubos sem anticoagulante);
 - ✓ Refrigerado e/ou congelado (-20°C).

- Principais amostras que podem ser coletadas na **necropsia**:
 - Fragmentos de pulmão, coração (músculo papilar do ventrículo esquerdo), artéria pulmonar, esôfago, pré-estômagos, cavidade oral (lábio, língua, palato, bochecha), músculos esqueléticos (região cervical, membros torácicos e membros pélvicos), baço, linfonodos, fígado e rins.
 - ✓ Formol a 10%.
 - Fragmentos de baço, linfonodos e pulmão;
 - ✓ Refrigerado e/ou congelado (-80°C).

- Exames requisitados:
 - Histopatológico;
 - ✓ Amostras fixadas em formol a 10%.

 - Sorologia (soro refrigerado ou congelado [-20°C]);
 - ✓ IDGA ou ELISA.

 - Detecção do vírus;
 - ✓ Isolamento viral:
 - Sangue total e tecidos (baço, linfonodos e pulmão) refrigerados.
 - Tecidos (baço, linfonodos e pulmão) congelados a - 80°C.

 - ✓ Inoculação intravenosa em ovos embrionados;
 - Sangue total e tecidos (baço, linfonodos e pulmão) refrigerados (máx. 24h).
 - Tecidos (baço, linfonodos e pulmão) congelados a - 80°C.

 - ✓ Métodos moleculares (RT-PCR);
 - Sangue total e tecidos (baço, linfonodos e pulmão) refrigerados (máx. 24h) e/ou congelados a - 80°C.