

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da
língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011

Thaís Garcia da Silva

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

São Paulo
2017

Thaís Garcia da Silva

**Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos,
São Paulo, Brasil, 2011**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edviges Maristela Pituco

Eu, Thaís Garcia da Silva, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data 05/ 07/ 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Silva, Thaís Garcia da.
Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011. / Thais Garcia da Silva. - São Paulo, 2017.
121 p.

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.**
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na produção animal.

Orientador: Edvigés Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Prevalence and spatial characterization of blue-tongue in cattle from São Paulo State, Brazil, 2011.

1. *Orbivirus* 2. *Reoviridae* 3. Sorologia 4. Virusneutralização I. Silva, Thaís Garcia da. II. Pituco, Edvigés Maristela. III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/Bibl./2017/012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Thaís Garcia da Silva

Título: Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 05/07/2017

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Del Fava

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Dolores Ursula Mehnert

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Alice M.M.P. Della Libera

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Meu Quilombo, minha fortaleza:

Jorge, Laudimara, Fernanda, Débora, Alamim e Heitor

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a. Edviges Maristela Pituco, por me receber em seu Laboratório, e também na Pós-Graduação do Instituto Biológico, pela orientação, confiança e por oferecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Giovanni Savini pela orientação durante o período de doutorado sanduíche no *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"* (IZSAM), Teramo, Itália, e por disponibilizar a estrutura laboratorial e banco de padrões virais de sorotipos do BTV, viabilizando a execução desta pesquisa.

À querida Prof^a. Dr^a. Claudia Del Fava, pela amizade, conselhos, ajuda inestimável e, principalmente, pelos ensinamentos, que levarei para minha vida profissional.

Aos médicos veterinários da Coordenadoria de Defesa Agropecuária pela colheita das amostras e por disponibilizá-las ao Laboratório de Vírus de Bovídeos para esta e outras pesquisas.

À M.Sc. Michele dos Santos Lima, pelo profissionalismo, amizade, companheirismo, desde a concepção do projeto até as análises dos resultados. Pelo estímulo e motivação nos momentos bons e ruins.

Às amigas, Maira Souza, Vívian Cardoso, Larissa de Paula e Adeline Fernandes, pela convivência, encontros, ajuda nos momentos de dificuldades e companheirismo.

À equipe do Departamento de Virologia do IZSAM: Massimo Spedicato, Irene Carmine, Liana Teodori, Alessandra Leoni, Annapia Di Gennaro, Maura Picella, Claudia Casaccia, Miriam Berti Sabrina Olivieri, Barbara Cipro, Daniela Malatesta, Guendalina Zaccaria, Valeria Marini, Ottavio Portanti e Alessio Lorusso, pelo aprendizado, ótimo convívio, disponibilidade e colaboração.

Aos amigos Vincenzo D'Innocenzo, Mirella Luciani, Micheli Podaliri, Dani, Luigi Iannett, Stafania Grilli, que tornaram um ano longe de casa muito mais especial: "bella situazione".

Às funcionárias, pesquisadoras e estudantes do Laboratório de Vírus de Bovídeos, Cláudia Pestana, Taís Caiuby, Marta Vicente, Alisete Assumpção, Líria Okuda, Adriana Nogueira, Eliana De Stefano, Antera Ferreira, Regina Paixão, Bianca Freire, Vinícius Scenegaglia e Priscilla Felício, pela colaboração.

Ao M.Sc. Flávio Henrique Mendes, pela colaboração nas análises climáticas, ao Dr. Alexandre L. R. Chaves, pela elaboração da Figura 1 desta Tese, e ao Roberto Tadeu pelo auxílio na biblioteca.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Biológico, ao Dr. Marcelo Eiras, Samira Farah Pizolato, aos docentes, funcionários, e também aos colegas de curso.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Alice M.M.P. Della Libera, Prof^a Dr^a. Claudia Del Fava, Prof^a Dr^a. Dolores Ursula Mehnert e Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelas correções, críticas e sugestões que enriqueceram este trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Doutorado e pela bolsa do PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior), apoio financeiro fundamental para a realização dos trabalhos no Brasil e no exterior.

EPÍGRAFE

*“...Por que não queria ser margem
Queria mesmo ser mar...”*

Débora Garcia

“A concordância é preguiçosa e a discordância é provocadora.”

Eduardo Portella

RESUMO

SILVA, Thaís Garcia. **Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011**. 2017. 121 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

O *Bluetongue virus* (BTV), gênero *Orbivirus*, família *Reoviridae*, apresenta partículas icosaédricas com diâmetro entre 60 e 85 nm. O genoma é constituído por dez segmentos de RNA de fita dupla, e apresenta elevada variabilidade genética, que, em parte, se traduz nos 29 sorotipos de BTV já identificados em diversos países. Mosquitos do gênero *Culicoides* respondem pela transmissão do vírus, que induz a doença conhecida como língua azul (LA), que pode afetar espécies de ruminantes. A LA é de notificação obrigatória e restringe a movimentação e comércio de animais em áreas livres. No Brasil, os bovinos infectados, normalmente, são assintomáticos com longos períodos de viremia (meses). A associação de temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento do vetor, e bovinos como fonte de infecção, garante a manutenção do vírus nos rebanhos. Este trabalho teve como objetivos: (i) identificar anticorpos neutralizantes para os sorotipos do BTV; (ii) realizar levantamento da distribuição dos sorotipos de BTV no Estado de São Paulo; (iii) realizar estudo de análise de risco para LA com base em práticas zootécnicas e sanitárias; e (iv) estudar a influência de fatores climáticos e associá-los aos sorotipos identificados. O Estado de São Paulo foi dividido em sete circuitos produtores de bovinos, tendo sido selecionado um animal reagente ao ensaio de ELISA por propriedade (de um total de 1.598 propriedades) e os soros foram submetidos à técnica de virusneutralização contra 25 sorotipos de BTV. Os fatores de risco foram analisados a partir de questionários com variáveis zootécnicas e sanitárias de cada propriedade, empregando análise univariada e regressão logística. A variável aquisição de bovídeos foi considerada fator de risco para a ocorrência da doença (OR = 2,183; IC 95% = 1,6-2,9). Nos circuitos 1, 2 e 3 foram observadas as maiores prevalências de BTV, sendo que no circuito 1, registraram-se as temperaturas mais elevadas do Estado. No presente trabalho, foram identificadas soroprevalências para 11 sorotipos: BTV-1 (22,15%), BTV-2 (31,03%), BTV-3 (18,96%), BTV-4 (24,90%), BTV-9 (6,82%), BTV-12 (7,50%), BTV-17 (23,90%), BTV-19 (10,20%), BTV-21 (30,66%), BTV-22 (12,14%), BTV-26 (57,00%). Neste trabalho, foi identificada pela primeira vez no Brasil evidência sorológica para os sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-9, BTV-21 e BTV-26.

PALAVRAS-CHAVE: BTV. *Orbivirus*. *Reoviridae*. Sorologia. Virusneutralização.

ABSTRACT

SILVA, Thaís Garcia. **Prevalence and spatial characterization of serotypes of bluetongue in cattle from São Paulo State, Brazil, 2011.** 2017. 121 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

The *Bluetongue virus* (BTV), genus *Orbivirus*, family *Reoviridae*, presents icosahedral particles with 60 to 85 nm in diameter. Its genome consists of ten segments of dsRNA and presents high genetic variability, with 29 BTV serotypes already identified in several countries. The virus, transmitted by mosquitoes of the genus *Culicoides*, induces the bluetongue disease, which can affect several ruminant species. Bluetongue is a disease of mandatory notification, and restricts movement and trade of animals in virus-free areas. In Brazil, infected cattle are usually asymptomatic with long periods (months) of viraemia. The association of favorable temperature and humidity to the development of the vector, and cattle as a source of infection guarantees the virus maintenance in the herds. The aims of this work were: (i) to identify neutralizing antibodies for BTV serotypes; (ii) to perform a survey of the distribution of the BTV serotypes in the State of São Paulo; (iii) to conduct a risk analysis study for bluetongue disease based on zootechnical and sanitary practices; and (iv) to study the influence of climatic factors and to associate them with the identified serotypes. The State of São Paulo was divided into seven regions (named circuits), and one animal reagent to ELISA was selected per farm (out of a total of 1,598 farms), and the sera were evaluated against 25 BTV serotypes by means of the virusneutralization technique. Risk factors were analyzed from questionnaires with zootechnical and sanitary variables of each farm, using univariate analysis and logistic regression. The variable bovidae acquisition was considered a risk factor for the occurrence of the disease (OR = 2.183, 95% CI = 1.6-2.9). In the circuits 1, 2, 3 the highest prevalences of BTV were observed, and circuit 1 showed the highest temperatures in the State. In the present study, seroprevalences were identified for 11 serotypes BTV-1 (22.15%), BTV-2 (31.03%), BTV-3 (18.96%), BTV-4 (24.90%), BTV-9 (6.82%), BTV-12 (7.50%), BTV-17 (23.90%), BTV-19 (10.20%), BTV-21 (30.66%), BTV-22 (12.14%), BTV-26 (57.00%). In this study, serological evidence for serotypes BTV-1, BTV-2, BTV-9, BTV-21 and BTV-26 was identified for the first time in Brazil.

KEYWORDS: BTV. *Orbivirus*. *Reoviridae*. Serology. Virusneutralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação esquemática da partícula de *Bluetongue virus* (BTV) evidenciando as diferentes proteínas estruturais e as três camadas dos capsídeos [externo (*outer capsid*) – formado pelas proteínas VP-2 e VP-5; intermediário (*intermediate capsid*) – formado pela proteína VP-7; e interno (*inner capsid*) – formado pela proteína VP-3]. Os capsídeos abrigam 10 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNAs) e três proteínas estruturais a eles associadas (VP-1, VP-4 e VP-6). Ilustração: Dr. A. L. R. Chaves. 11
- Figura 2- Reconstrução filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidos da proteína VP-2 dos 27 sorotipos de *Bluetongue virus* (BTV) por *Neighbor-joining* e análise de *bootstrap* com 1.500 replicações (valores indicados nos ramos) com o programa MEGA 5.2. A barra indica o número de substituições por sítio. As letras maiúsculas (A a L) indicam os sorogrupos (clados) de acordo com Maan et al. (2011) e Zientara et al. (2014). 16
- Figura 3- Representação esquemática do padrão de eletroforese (em gel de agarose 1%) dos dez segmentos de RNA lineares (Seg-1 a Seg-10) do BTV, em ordem decrescente de seus respectivos pesos moleculares e as respectivas proteínas codificadas (SILVA, 2017). 17
- Figura 4- Ciclo simplificado de transmissão do *Bluetongue virus* (BTV) em bovinos com a presença do inseto vetor (fêmeas de *Culicoides sp.*) (SILVA, 2017). 20
- Figura 5 - Linha do tempo com a relação dos principais fatos relacionados à ocorrência e detecção do BTV no Brasil. ¹Groocok; Campbell (1982); ²Moreira; Silva; Viana, 1980; ³Cunha; Souza; Teixeira, 1982; ⁴Abreu, 1982; ⁵Cunha; Souza; Passos, 1987; ⁶Cunha; Souza; Teixeira 1988; ⁷Clavijo et al., 2002; ⁸Costa, 2000; ⁹Melo et al., 2000, ¹⁰Lobato et al., 2001; ¹¹Silva (2001); ¹²Silva (2002); ¹³Antoniassi et al., 2010; ¹⁴Nogueira et al., 2008; ¹⁵Alves et al., 2009; ¹⁶Venditti, 2009; ¹⁷Balero et al., 2014; ¹⁸Guimarães et al. (Dados não publicados); ¹⁹OIE (2016). 30
- Figura 6 - Circulação de sorotipos de BTV e zonas de restrição europeias, definidas pela Comissão de Regulação Europeia. Mapa atualizado em fevereiro de 2017 e retirado da internet no site https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/bluetongue_en em acesso em março/2017. 37
- Figura 7- Mapa do Estado de São Paulo subdividido em sete macrorregiões (circuitos) produtoras de bovinos [Adaptado de Dias et al. (2009)]. 39
- Figura 8 - Esquema da Placa 1 de controle, com solução viral de 100-300 TCID₅₀ (t.q.), onde controle de atividade viral (kv), controle de célula (kc) e controles de soro positivo e negativo (S+ e S-). 44

- Figura 9- Esquema de placa de soros testados por VN (S1, S2, S3, S4, Sn) realizadas com diluição de 1:10 até 1:80.44
- Figura 10 - Mapa do Estado de São Paulo dividido em mesorregiões, com a localização das 26 estações meteorológicas consultadas neste trabalho (elaborado a partir da base cartográfica do IBGE).49
- Figura 11- Efeito citopático característico de BTV-2 em soro teste com ausência de anticorpos (A) e células Vero não infectadas (ausência de ECP) em cavidade da placa com soro teste contendo anticorpos anti-BTV-2 (B), visualizado em microscópio invertido (aumento 10x).50
- Figura 12- Comparação de três reações de virusneutralização frente ao BTV-4 (isolado brasileiro) e BTV-4 (isolado italiano) em amostras de soro de fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses do Estado de São Paulo, no ano de 2011, (legenda- BTV-4 Brasi, BTV-4 Brasil- VN método italiano, BTV-4 Itália)..... 63
- Figura 13- Árvore filogenética obtida com o auxílio do Programa MEGA 6.0, utilizando o método de *Neighbor-Joining*, do alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos da proteína VP-2 dos diferentes sorotipos de BTV (1 a 27). Foram destacados, no retângulo azul, os isolados de BTV-4 provenientes do Brasil (dados não publicados), Itália e África do Sul, os quais formam um grupo consistente com valor de *bootstrap* de 100%. A barra refere-se ao número de substituições por sítio 64
- Figura 14- Alinhamento parcial dos primeiros 300 aminoácidos da proteína VP-2 (*outer capsid*) de isolados de BTV-4 provenientes do Brasil (BTV_4_Bras – seqüência não publicada) e Itália (BTV_4_Ital – código de acesso no GenBank - KM233615.1). Observam-se diferenças de aminoácidos entre os isolados em diversas posições..... 65
- Figura 15- Distribuição de bovinos reagentes aos sorotipos de *Bluetongue virus* (BTV), identificados por virusneutralização em sete macrorregiões (circuitos de 1 a 7) do Estado de São Paulo. Os sorotipos estão indicados em cores diferentes, de acordo com os respectivos sorogrupos (A, B, C, E, F, G, H, I, L). 66
- Figura 16- Mapa das precipitações (mm) médias do Estado de São Paulo obtido a partir do registro de 26 estações meteorológicas no ano de 2011..... 68
- Figura 17- Mapa das temperaturas (°C) médias do Estado de São Paulo obtido a partir do registro de 26 estações meteorológicas no ano de 2011..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Relação dos principais vírus causadores de doenças em rebanhos bovinos no Brasil	6
Tabela 2- Relação das subfamílias, gêneros, número de componentes genômicos, camadas do capsídeo e hospedeiros dos vírus da família <i>Reoviridae</i>	12
Tabela 3- Espécies e respectivos vetores e hospedeiros do gênero <i>Orbivirus</i>	13
Tabela 4- Características dos segmentos genômicos e das proteínas do <i>Bluetongue virus</i> (BTV)	18
Tabela 5- Distribuição do número total de propriedades e animais amostrados, divididos por circuito produtor de bovinos e municípios do Estado de São Paulo.	39
Tabela 6- Título viral de 25 sorotipos de BTV testados nas reações de VN, contendo 100 - 300 TCID ₅₀ em 50µL (por cavidade)	43
Tabela 7- Localização das 26 estações meteorológicas consultadas no Estado de São Paulo.	48
Tabela 8-Títulos de anticorpos neutralizantes em soro de bovinos do Estado de São Paulo (2011) frente aos sorotipos de BTV	51
Tabela 9- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-1 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	52
Tabela 10- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-2 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	52
Tabela 11- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-3 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	53
Tabela 12- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-4 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	53
Tabela 13- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-9 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	54
Tabela 14- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-12 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	54
Tabela 15- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-17 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.	55

Tabela 16- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-19 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.....	55
Tabela 17- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-21 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.....	56
Tabela 18- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-22 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.....	56
Tabela 19- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-26 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.....	57
Tabela 20- Prevalência aparente de sorotipos de BTV no Estado de São Paulo, no ano de 2011.....	57
Tabela 21- Prevalência aparente dos sorogrupos de BTV no Estado de São Paulo (2011)...	58
Tabela 22- Análise univariada (qui-quadrado) dos rebanhos de bovinos reagentes e não reagentes ao BTV no Estado de São Paulo, no ano de 2011, considerando as variáveis não estatisticamente significativas ($p>0,20$).	59
Tabela 23- Modelo final da regressão logística multivariada de fatores de risco (Odds Ratio) para a BTV em bovinos do Estado de São Paulo, no ano de 2011.	61
Tabela 24- Comparação de três reações de virusneutralização quanto aos títulos de anticorpos na escala logaritma de base 10 frente ao BTV-4 (isolado brasileiro) e BTV-4 (isolado italiano) em amostras de soro de fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses do Estado de São Paulo, no ano de 2011.....	62

LISTA DE SIGLAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
- Ag – Antígeno
- Ac – Anticorpo
- ATB – Antibiótico
- AINP-BT – *All-India Network Program on Bluetongue*
- APP – Áreas de Preservação Permanente
- BHK-21 – *Baby Hamster Kidney* (Linhagem celular de rins de hamster)
- BHF – *Beatrice Hill Farm*
- BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
- BTV – *Bluetongue virus*
- BSE – Encefalopatia Espongiforme Bovina
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- CPAE – *Calf Pulmonary Artery Endothelial Cell*
- CDA – Coordenadoria de Defesa Agropecuária
- cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar
- CP – *Coat Protein* (proteína capsidial)
- dsRNA – RNA de fita dupla
- DICC₅₀ – Doses infectantes em cultura de célula 50%
- EDA – Escritórios de Defesa Agropecuária
- ECP – Efeito Citopático
- EIP – Período de Incubação Extrínseco
- EHDV – Vírus da doença epizootica hemorrágica
- ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- ELISA-CFS – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - por competição de fase sólida
- EU – União Europeia
- EUA – Estados Unidos da América
- FC – Fixação do complemento
- IA – Inseminação artificial
- IB – Instituto Biológico
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IDGA – Imunodifusão em Gel de Ágar
IEA – Instituto de Economia Agrícola
IF – Imunoflorescência
IgG – Imunoglobulina G
IH – Inibição de Hemaglutinação
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
IZSAM – *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"*
kc – Controle de célula
kv – Controle de atividade viral
LA – Língua Azul
LAMP – *Loop-Mediated Isothermal Amplification*
LVB – Laboratório de Viroses de Bovídeos
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM – Minimal Essential Medium (Meio Essencial Mínimo)
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
NS1 – *non-structural*
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
OEG – Ovo embrionado de galinha
OIE – *World Organisation for Animal Health*
ORF – *Open Reading Frame*
Panaftosa – Centro Pan-Americano de Febre Aftosa
PNEFA – Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa
pb – pares de bases (nitrogenadas)
PIB – Produto Interno Bruto
PCR – Reação em cadeia da Polimerase
PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
qPCR – PCR quantitativo (PCR em tempo real)
RNA – Ácido Ribonucleico
RdRp – RNA polimerase dependente de RNA
RT – *Reverse Transcriptase*
RT-PCR – *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*
SFB – Soro Fetal Bovino
TCID₅₀ – Dose infectante em cultura de tecidos 50%
t.q. – *Tale quale*

VERO – Linhagem celular de rim de macaco verde
VLPs – *Virus Like Particles* (partículas do tipo viral)
VN – Virusneutralização
VP – *Viral Protein* (Proteína viral)
VPA – valor da produção agrícola
UC – Unidades de Conservação

LISTA DE ABREVIATURAS

h – Hora

Min – Minuto

Neg – Negativo

Pos – Positivo

Seg – Segmento

s – segundo

LISTA DE SÍMBOLOS

mL – Mililitro

μL – Microlitro

°C – Grau Celsius

® – Marca Registrada

g – Grama

g – Força centrífuga

Km² – Quilômetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos Gerais	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Bovinocultura no Brasil com foco em sanidade.....	4
3.2 A bovinocultura no Estado de São Paulo	8
4 <i>Bluetongue virus</i> (BTV), o “vírus da língua azul”: classificação, propriedades biológicas e moleculares, histórico, distribuição geográfica e epidemiologia	9
4.1 Histórico, classificação e taxonomia	9
4.2 <i>Bluetongue virus</i> (BTV): características gerais e propriedades biomoleculares	13
4.3 Aspectos relacionados com a transmissão do BTV	18
4.3.1 O vetor	18
4.3.2 Transmissão	19
4.3.3 Outras formas de transmissão	21
4.3.4 Círculo de hospedeiros e sinais clínicos	22
4.3.5 Patogênese do vírus da língua azul	24
4.3.6 Epidemiologia da língua azul e sua distribuição no Brasil e no mundo	25
4.4 Diagnóstico.....	31
4.5 Prevenção e Controle.....	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Amostragem e análise de dados.....	38
5.1.1 Análise de risco.....	40
5.2 Sorodiagnóstico	41
5.2.1 Cultivo celular.....	41
5.2.2 Multiplicação celular	41
5.2.3 Vírus.....	42
5.2.4 Titulação viral	42
5.2.5 Virusneutralização (VN).....	43
5.2.6 Preparo do vírus	45
5.2.7 Repetição de virusneutralização para BTV-4	46

5.2.8 Análises de sequências <i>in silico</i>	46
5.3 Estudo de fatores climáticos	47
5.3.1 Climogramas	49
6 -RESULTADOS.....	50
6.1 Análise por sorotipo de BTV	52
6.1.2 Análise por sorogrupo de BTV	58
6.1.3 Análise de fatores de risco	59
6.1.4 Repetições de virusneutralização para o BTV- 4.....	62
6.1.5 Análises <i>in silico</i>	63
6.1.6 Estudo climático.....	67
7 DISCUSSÃO.....	70
8 CONCLUSÕES.....	83
9 REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira é uma das mais competitivas do mundo (EUCLIDES FILHO, 2004; FERRAZ; FELICIO, 2010, IBGE, 2016). Essa posição de destaque deve-se, principalmente, à sua relação de custos de produção e quantidade produzida. Ao longo do século XX, a atividade ultrapassou as barreiras da subsistência local para a formação de uma cadeia composta pela produção de animais, processamento e distribuição nos âmbitos nacional e internacional (CALLEMAN; CUNHA; ALCANTARA, 2009), consolidando o Brasil, de acordo com dados do USDA e da FAO, como detentor do maior rebanho bovino comercial e segundo maior exportador de carne do mundo (FAR MNEWS, 2017).

O Estado de São Paulo destaca-se com a cadeia produtiva da bovinocultura, ocupando o segundo lugar dentre os mais importantes grupos na exportação do agronegócio paulista, perdendo apenas para o complexo sucroalcooleiro (IEA, 2016). Entretanto, os problemas sanitários são considerados um dos principais fatores limitantes da produção dos rebanhos, pois além de encarecer o processo produtivo, reduzem a qualidade do produto final, podendo acarretar em graves consequências socioeconômicas de importância sobre o comércio internacional de animais e seus produtos.

Neste contexto, a língua azul (LA), em inglês denominada de *bluetongue*, é uma doença infecciosa, induzida pelo “vírus da língua azul”, *Bluetongue virus* (BTV), o qual é transmitido, principalmente, por mosquitos de diversas espécies do gênero *Culicoides* (RONDEROS et al., 2003). É considerada doença de notificação obrigatória, devido à sua patogenicidade e grande potencial de transmissão/difusão. Os surtos da doença na Europa, na década de 2000, levaram a Organização Mundial de Saúde Animal a classificá-la como uma doença de caráter “reemergente”, responsável por causar diversos prejuízos à produção bovina, tais como abortos, queda do desempenho reprodutivo, perda de condição corporal e redução na produção de leite (OIE, 2008).

Os ruminantes são os mais suscetíveis à infecção pelo BTV, sendo que ovinos e cervídeos são as espécies que normalmente apresentam lesões mais graves (COSTA et al., 2006). Os bovinos e caprinos são infectados pelo BTV, mas raramente desenvolvem a doença, geralmente caracterizada por uma viremia prolongada, que pode durar até 60 dias (OIE, 2012). Devido a essas características, os bovinos atuam como reservatórios do BTV,

a partir dos quais os vetores podem se infectar e transmitir o vírus a outros ruminantes, como, por exemplo, os ovinos (GORCHS; LAGER, 2001).

Grande parte do território brasileiro encontra-se inserido dentro da zona endêmica para o BTV, região demarcada por condições climáticas adequadas ao desenvolvimento do vetor (GIBBS; GREINER, 1994). A primeira referência do BTV no Brasil, e também na América do Sul, data de 1978, quando foi relatada à OIE a evidência sorológica da ocorrência do vírus (SILVA, 1978; LOBATO, 1999; LAGER et al., 2004). Posteriormente, diversos estudos evidenciaram alta frequência de animais portadores de anticorpos contra o BTV (LOBATO, 1996; PELLEGRIN et al., 1997; MELO et al., 2000; LOBATO et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2008; VENDITTI, 2009; BERNARDES, 2011). Entretanto, são poucos os relatos de casos clínicos da doença, indicando que a enfermidade tem se disseminado, sem ser percebida, pelos rebanhos do país.

Nos últimos anos, no Brasil, pesquisas sobre o BTV têm sido realizadas, incluindo estudos soropidemiológicos com bubalinos, ovinos e bovinos. Porém, até o momento, nenhum levantamento da ocorrência dos diferentes sorotipos do vírus (atualmente foram identificados 29 sorotipos de BTV) foi realizado, e pouco se avançou no conhecimento da doença e dos aspectos da distribuição e disseminação do vírus (LOBATO; GUEDES; MATOS, 2015). Portanto, o presente trabalho teve como principal objetivo determinar a soroprevalência e identificar os sorotipos de BTV prevalentes nos rebanhos no Estado de São Paulo. Além disso, foram avaliados os fatores de risco para a ocorrência da doença nas propriedades amostradas, de modo a contribuir com a defesa sanitária animal e implementação de futuros programas de vigilância epidemiológica de BTV. Esses estudos poderão fornecer informações para o avanço das pesquisas relacionadas à produção de vacinas contra os diferentes sorotipos circulantes no Brasil. Os objetivos gerais e específicos deste trabalho são relacionados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho propõe, por meio de imunodiagnóstico em soros de bovinos e dados coletados por médicos veterinários da Coordenadoria de Defesa Agropecuária em 2011, caracterizar, no tempo e no espaço, a prevalência de sorotipos e os fatores de risco de infecções pelo BTV no Estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a identificação de anticorpos neutralizantes específicos para diferentes sorotipos do BTV (BTV-1 ao -26, exceto o sorotipo -25);
- Mapear a distribuição espacial das propriedades amostradas aos sorotipos de BTV identificados no Estado de São Paulo;
- Realizar estudo de análise de risco para língua azul com base em práticas zootécnicas e sanitárias das propriedades que possuem animais reagentes ao BTV;
- Estudar a influência de fatores climáticos entre as regiões e associá-los aos sorotipos identificados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bovinocultura no Brasil com foco em sanidade

No Brasil, a bovinocultura fez-se presente desde o início da colonização, influenciando no processo de ocupação e desenvolvimento econômico do país. Em 1534, durante o período colonial, iniciou-se a introdução do gado zebuino (*Bos indicus*) no Brasil. Os animais, trazidos à Capitania de São Vicente, vindos do Arquipélago de Cabo Verde, possessão portuguesa na Costa da África, eram utilizados inicialmente em trabalhos de lavoura e para alimentação. Em torno de 1870-1875 ocorreram as primeiras importações de animais voltadas à criação, por encomenda de pecuaristas do Rio de Janeiro e da Bahia. Estas importações foram motivadas pelos baixos índices de desempenho das raças europeias em condições brasileiras. A entrada de bovinos, no Brasil, ocorreu em três correntes de acordo com as regiões de origem: (i) bovinos trazidos de Açores e Cabo Verde, que originaram os grandes rebanhos crioulos, muito adaptados, porém pouco produtivos; (ii) bovinos de raças europeias especializadas, que logo se degeneraram na região central e tiveram o seu estabelecimento como raças puras somente na região sul do Brasil, e (iii) bovinos zebuínos, vindos da Índia, que encontraram no Brasil condições propícias à sua expansão (AZEVEDO, 2007).

Embora durante o período colonial tenha sido introduzido número muito maior de bovinos europeus do que de zebuínos, logo se evidenciou a falta de adaptação das raças europeias, o que estimulou as importações do gado zebu, mais rústico e resistente. Possivelmente, junto com estes animais, foram introduzidos patógenos (vírus, bactérias, fungos) e parasitas, dos quais ainda não se havia registros no Brasil. Em 1921, o governo brasileiro proibiu oficialmente a entrada de gado indiano no país, devido à ocorrência de peste bovina em alguns animais importados. Essa restrição às importações durou cerca de nove anos. A erradicação da peste bovina foi confirmada pela Organização Mundial de Saúde Animal em 2011, sendo considerada a segunda doença erradicada pelo homem após a varíola (OIE, 2012).

Ao longo dos anos, a produção pecuária evoluiu no Brasil, passando de uma simples atividade de subsistência familiar para a posição de abastecedor mundial de proteína animal (LEMOS, 2013). Essa posição de grande produtor para atender o mercado interno e externo é resultado da revolução verde e de importantes avanços biotecnológicos, além da

modernização do parque industrial brasileiro nas décadas de 1960 e 1970 e da expansão internacional da indústria processadora de carne (CAMPOS, 1994).

Os seguintes avanços tecnológicos aplicados à pecuária, que permitiram o incremento da qualidade e quantidade produzida, podem ser destacados: (i) melhoramento genético animal; (ii) pastagens plantadas e adaptadas às condições geoclimáticas locais; (iii) uso de defensivos e fertilizantes; e (iv) maior investimento em capacitação profissional. Além disso, o desenvolvimento de políticas públicas que permitem que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate e o maior controle da sanidade animal e segurança alimentar, contribuíram para que o país atendesse às exigências dos mercados internacionais rigorosos e, conseqüentemente, conquistasse espaço no cenário mundial (MAPA, 2014).

O Brasil possui 209,13 milhões de cabeças de gado distribuídas em 167 milhões de hectares, com uma lotação de 1,25 cabeças por hectare, representando 14% do total da produção mundial de carne, sendo detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo (FARM NEWS, 2017). O Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil chegou a R\$ 5,9 trilhões, o PIB do agronegócio alcançou R\$ 1,26 trilhão, representando 21% do PIB total brasileiro. Já o PIB da pecuária chegou a R\$ 400,7 bilhões, representando 30% do agronegócio brasileiro (ABIEC, 2016). Além disso, o Brasil está entre os líderes de exportação de carne, com vendas para mais de 180 países. Tais indicadores econômicos e a presença da atividade em todos os estados brasileiros evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura do país (MAPA, 2014).

O rebanho bovino brasileiro é composto por 80% de raças zebuínas (*Bos indicus*), que correspondem a animais de comprovada rusticidade e adaptação às diferentes regiões do Brasil. Dentre essas raças, destaca-se a Nelore com 90% do total do rebanho nacional. O clima predominantemente tropical e a extensão territorial do país contribuem para os índices da bovinocultura, uma vez que permitem a criação dos animais em áreas de pastagens em sistemas de criação extensiva e semiextensiva (MAPA, 2014; ABIEC, 2016).

A sanidade do rebanho é extremamente importante para evitar o aparecimento de doenças que possam comprometer os índices de produtividade. Doenças infecciosas, por exemplo, como as causadas por vírus (Tabela 1), são endêmicas em rebanhos bovinos no Brasil, sendo uma das principais causas de morte de animais, perda da eficiência produtiva, queda na produção de leite e de ganho de peso, condenação de carcaças e restrição à exportação. As viroses, por induzirem esses prejuízos, tanto na produção de carne como de leite, estão associadas às doenças mais economicamente importantes para a produção de bovinos (PEREZ et al., 2002).

Tabela 1-Relação dos principais vírus causadores de doenças em rebanhos bovinos no Brasil

Família	Gênero	Espécie	Enfermidade/ Sintomas
<i>Adenoviridae</i>	<i>Atadenovirus</i>	Adenovírus bovino (BAdV-D)	Infecção subclínica ou doença respiratória leve
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Coronavírus Bovino (BCoV)	Gastrenterite
<i>Flaviviridae</i>	<i>Pestivirus</i>	Vírus da diarreia viral bovina tipo 1 e 2 BVDV- 1, BVDV- 2 e Hobi-like	Diarreia viral bovina
<i>Herpesviridae</i>	<i>Varicellovirus</i> <i>Simplexvirus</i>	Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	Rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular
		Herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2)	infecciosa/balanopostite pustular infecciosa, abortos/
		Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)	mamilite herpética/ encefalite herpética
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Macavirus</i>	Febre catarral maligna (OHV-2)	Herpesvírus ovino Lesões vesiculares
<i>Parvoviridae</i>	<i>Bocaparvovirus</i>	Parvovírus bovino	Gastrenterite
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i> <i>Pneumovirus</i>	Vírus da Parainfluenza Bovina 3(PIV-3) Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV)	Doenças respiratórias e pulmonares
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	Papilomavírus bovino – 1, 4, 3, 5, 7	Papilomas com lesões cutâneas e de mucosas
<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	Vírus da Varíola Bovina	Lesões vesiculares em tecidos e mucosas
	<i>Parapoxvirus</i>	Vírus da Pseudovaríola Bovina, Vírus da Estomatite papular bovina	Lesões vesiculares em tecidos e mucosas
<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	<i>Bluetongue virus (BTV)</i>	Língua Azul
	<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus Bovino</i>	Diarreia dos bezerros
<i>Retroviridae</i>	<i>Deltaretrovirus</i>	Vírus da Leucemia Bovina (BLV)	Leucose Bovina
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i> <i>Lyssavirus</i>	Estomatite Vesicular Raiva	Lesões vesiculares Síndrome neurológica

Fonte: Compilado de vários autores: Flores (2007); ICTV (2016).

Quando se discute sobre as barreiras de caráter sanitário, duas doenças merecem destaque, em função de sua relevância nas exportações brasileiras de carne bovina: a febre aftosa, virose induzida pelo *Foot-and-mouth disease virus*; e a encefalopatia espongiforme

bovina (BSE), também conhecida como doença da vaca louca, causada por príon (proteína infecciosa). O Brasil encontra-se há mais de 10 anos sem relato de qualquer foco de aftosa, sendo que essa conquista foi resultado do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA). Atualmente, o país é classificado pela OIE como zona livre de febre aftosa com vacinação, sendo que 77,2% do território nacional são reconhecidos como livres de febre aftosa, área que engloba 25 Estados brasileiros, ou seja, 99% do rebanho doméstico susceptível do país são criados em zona livre de febre aftosa com vacinação. Vale ressaltar que a zona livre de febre aftosa (sem vacinação) contempla o Estado de Santa Catarina. A classificação de níveis de risco para essa doença leva em consideração não só a presença do vírus ou ocorrência de casos clínicos da doença, mas também a qualidade do serviço veterinário, a situação de áreas vizinhas, a cobertura vacinal, entre outros critérios (MAPA, 2014). A febre aftosa representa uma ameaça para o bem estar da população, devido ao seu impacto sobre a economia de diversos países. Os produtos comercializados devem ser oriundos de rebanhos livres desta enfermidade, demonstrando a estreita relação existente entre saúde pública, ambiente, bem-estar social e a economia como um todo (PITUCO, 2006).

Com relação à BSE, mesmo após os dois casos atípicos da doença registrados um no Estado do Paraná em 2012 e outro no Estado do Mato Grosso, em 2014, as autoridades internacionais reconheceram a vigilância sanitária desenvolvida no Brasil, e classificaram o país como de "Risco Insignificante" (MAPA, 2014).

Em virtude de risco à saúde pública, da diminuição da produtividade dos rebanhos infectados, das perdas econômicas para o produtor e de uma possível diminuição de competitividade do produto nacional (bovinos, carne, leite e derivados) no comércio internacional, o MAPA tem investido em programas de sanidade animal. Esses programas têm a finalidade de salvaguardar a saúde do rebanho bovino brasileiro e evitar a imposição de barreiras não tarifárias pelos países importadores, como: o Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa-(PNEFA); o Programa Nacional de Raiva dos Herbívoros e outras Encefalopatias (PNCRH); e o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (MAPA, 2001). Os programas têm como objetivos específicos: a redução da prevalência e da incidência de novos casos de determinadas doenças, bem como a criação de um número significativo de propriedades certificadas e/ou monitoradas, que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (MAPA, 2014).

Neste contexto, a língua azul (LA) é uma enfermidade de notificação compulsória, que faz parte da lista de doenças para diagnóstico diferencial de febre aftosa, de acordo com o PNEFA. Entre as preocupações com as consequências socioeconômicas causadas pela LA, na cadeia produtiva da bovinocultura, destacam-se: as perdas pelas restrições na importação e exportação de animais (e de sêmen), e os transtornos reprodutivos relatados na Europa (COSTA et al., 2006; OIE, 2008). Além disso, a importância e a complexidade do papel do gado bovino como reservatório do vírus, o contínuo surgimento de focos de infecção e/ou da doença em diversos países e a contaminação de produtos biológicos têm dificultado o comércio destes produtos em países do Mercosul, Estados Unidos e Europa (VENDITTI, 2009).

3.2 A bovinocultura no Estado de São Paulo

O Estado de São Paulo, localizado ao sul da região sudeste do Brasil, tem uma extensão territorial de 248.222,362 Km², o que corresponde a 2,9% do território nacional. Possui 645 municípios e faz fronteira com Minas Gerais (norte e nordeste), Rio de Janeiro (nordeste), Paraná (sul), Mato Grosso do Sul (oeste) e Oceano Atlântico (leste) (IBGE, 2016).

A cadeia produtiva da bovinocultura apresenta-se como uma das principais atividades agropecuárias do Estado de São Paulo, superada somente pela cana-de-açúcar. A carne bovina corresponde a 10,7% do valor da produção agrícola (VPA), contabilizando R\$ 6,6 bilhões dos R\$ 61,5 bilhões totalizados na agropecuária do Estado. Concentradas na região oeste do Estado, São Paulo possui um rebanho bovino superior a 10 milhões de cabeças, com destaque para os municípios de Presidente Prudente, Presidente Venceslau, Andradina, General Salgado e São José do Rio Preto. As criações são predominantemente extensivas, e os animais, em sua maioria, são da raça zebuína (ABIEC, 2016). Apesar do Estado de São Paulo não deter o maior rebanho nacional (concentrado, atualmente, no Estado de Mato Grosso), possui condições climáticas adequadas para a produção. Além disso, conta com serviços de assessoria para o manejo fitotécnico, com uso eficiente da pastagem e qualidade genética dos animais, aliados a programas de manejo sanitário e programas de vacinação contra as principais doenças que ameaçam a sanidade do rebanho. Esses fatores proporcionam um bom desempenho, não somente dos animais, mas também da economia do setor.

O Estado paulista possui um importante papel na cadeia produtiva da bovinocultura nacional, com 128.238 propriedades com bovinos, nas quais 73,34% de seus animais são exclusivamente destinados para corte. Destaca-se também na exportação de carne bovina, representando 27,5% da produção nacional, além de ser o líder no segmento da indústria de transformação de proteína animal e principal centro de consumo brasileiro (IBGE, 2016; ABIEC, 2016). Com a instalação de diversos frigoríficos por todo o Estado, São Paulo ocupa o segundo lugar no ranking nacional de capacidade de abate, considerando os serviços de inspeção federal, estadual e municipal, estando atrás somente do Estado do Mato Grosso. Com um rebanho de tais proporções, os produtores e as autoridades sanitárias devem sempre estar atentos ao planejamento sanitário e estabelecerem estratégias de manejo dentro e fora da propriedade, com o objetivo de controlar preventivamente as doenças que podem afetar direta ou indiretamente o desenvolvimento do setor.

4 *Bluetongue virus* (BTV), o “vírus da língua azul”: classificação, propriedades biológicas e moleculares, histórico, distribuição geográfica e epidemiologia

4.1 Histórico, classificação e taxonomia

A língua azul (LA) foi originalmente reconhecida como doença de ovinos e bovinos na África do Sul, no final do século XVIII, sendo publicada na literatura científica como *malarial catarral fever* ou "Epizootia Catarral das Ovelhas". Em 1905, foi sugerido o nome *bluetongue* referindo-se à cianose de língua, um dos sinais clínicos da doença. No ano seguinte, 1906, associou-se a presença de um vírus como o agente etiológico da doença, mais tarde denominado *Bluetongue virus* (BTV). Inicialmente, foi reconhecida como doença de ruminantes restrita ao continente africano. Contudo, a confirmação da doença fora do continente africano se deu no Chipre, em 1924, sendo constatado um importante surto de LA nos anos de 1943 e 1944, que levou à morte de aproximadamente 2.500 ovelhas (70% de mortalidade em animais infectados). Sugeriu-se, na ocasião, que cepas menos virulentas tinham causado os primeiros surtos não reconhecidos na ilha. A doença foi reconhecida subsequentemente nos Estados Unidos, em 1948, e ao sul da Europa, em 1956, causando a morte de aproximadamente 75% dos animais afetados. Os surtos de LA no Oriente Médio, Ásia, Europa e Estados Unidos, no início dos anos 1940 e 1950, levou à sua descrição como uma “doença emergente” (ROY, 2008).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2016), *Bluetongue virus* (BTV) é a espécie tipo do gênero *Orbivirus*, subfamília *Sedoreovirinae*, família *Reoviridae*, que, atualmente, é considerada a maior família de todos os vírus de fita dupla de RNA (dsRNA). Além disso, esta família é a mais diversificada em termos de gama de hospedeiros, sendo que espécies de *Reoviridae* podem infectar fungos, plantas, animais invertebrados (artrópodes e moluscos) e vertebrados (peixes, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem). Os genomas das espécies de vírus pertencentes a esta família podem ser constituídos de 10, 11 ou 12 segmentos de dsRNA. Os vírions têm morfologia icosaédrica e tamanho característico (60-85 nm de diâmetro), não apresentam envelope lipídico, e são constituídos por proteínas arranjadas em duas ou três camadas concêntricas, que normalmente refletem a simetria icosaédrica (Figura 1). Os 15 gêneros reconhecidos de *Reoviridae* estão agrupados em duas subfamílias (*Sedoreovirinae* e *Spinareovirinae*) (Tabela 2), e podem ser diferenciados de acordo com as seguintes características: tamanho, número de camadas e estrutura do capsídeo, número de segmentos do genoma, natureza e número das proteínas estruturais, e padrão de reatividade com antissoros. Um dos mecanismos relacionados à variabilidade genética dos reovírus é o processo conhecido por rearranjo (*reassortment*), que consiste na troca de segmentos genômicos, comum em células infectadas por um ou mais vírus relacionados. O rearranjo de genomas, normalmente, determina o surgimento de estirpes de uma mesma espécie dentro de cada gênero da família *Reoviridae* (MERTENS; ATTOUI; MELLOR, 2008).

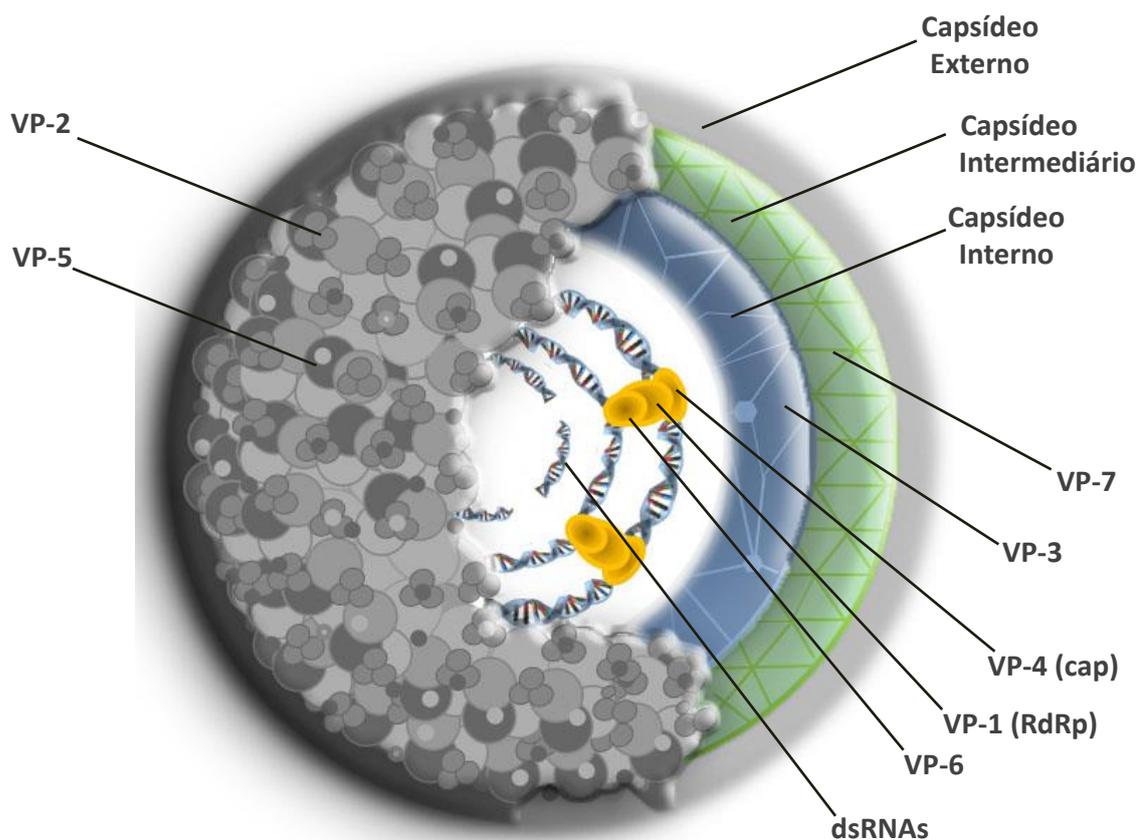


Figura 1 - Representação esquemática da partícula de *Bluetongue virus* (BTV) evidenciando as diferentes proteínas estruturais e as três camadas dos capsídeos [externo (*outer capsid*) – formado pelas proteínas VP-2 e VP-5; intermediário (*intermediate capsid*) – formado pela proteína VP-7; e interno (*inner capsid*) – formado pela proteína VP-3]. Os capsídeos abrigam 10 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNAs) e três proteínas estruturais a eles associadas (VP-1, VP-4 e VP-6). Ilustração: Dr. A. L. R. Chaves.

O gênero *Orbivirus* contém, atualmente, 22 espécies reconhecidas pelo ICTV (ICTV, 2016 – www.ictvonline.org). Dessas espécies, há vírus que induzem doenças severas, tanto em animais domésticos quanto em animais selvagens. Há outras que infectam aves e mamíferos, incluindo animais destinados à produção como ruminantes (bovinos, ovinos, caprinos), equídeos, camelídeos, entre outros.

Tabela 2- Relação das subfamílias, gêneros, número de componentes genômicos, camadas do capsídeo e hospedeiros dos vírus da família *Reoviridae*.

Subfamílias/Gêneros	Nº de segmentos de RNA	Nº de camadas do capsídeo	Hospedeiros
<i>Sedoreovirinae</i>			
<i>Cardoreovirus</i>	12	3	Artrópodes
<i>Mimoreovirus</i>	11	3	Protistas fotossintéticos marinhos (Micromonas).
<i>Orbivirus</i>	10	3	Mamíferos, aves e artrópodes ^a
<i>Phytoreovirus</i>	12	3	Plantas e insetos ^a
<i>Rotavirus</i>	11	3	Mamíferos e aves
<i>Seadornavirus</i>	12	3	Humanos, mamíferos e mosquitos ^a
<i>Spinareovirinae</i>			
<i>Aquareovirus</i>	11	2	Peixes e moluscos
<i>Coltivirus</i>	12	3	Mamíferos e artrópodes ^a
<i>Cypovirus</i>	10	1	Insetos
<i>Dinovernavirus</i>	9	1	Desconhecido. Replica em uma variedade de linhagens de células de mosquito
<i>Fijivirus</i>	10	2	Plantas e insetos ^a
<i>Idinoreovirus</i>	10	2	Insetos
<i>Mycoreovirus</i>	11/12	2	Fungos
<i>Orthoreovirus</i>	10	2	Mamíferos, aves e répteis
<i>Oryzavirus</i>	10	2	Plantas e insetos ^a

Fonte: compilado de vários autores: Mertens; Attoui; Mellor (2008); ^aAtua como vetor na transmissão para outros hospedeiros.

Os orbivírus são transmitidos por carrapatos ou insetos hematófagos, sendo capazes de se replicar nesses vetores e, portanto, são denominados de “arbovírus” ou “vírus transmitidos por artrópodes” (*arthropod-borne viruses*). Na Tabela 3 estão relacionadas as espécies de *Orbivirus* e seus respectivos vetores e hospedeiros, com destaque para o BTV, vírus que induz a doença da língua azul (*bluetongue*), tema do presente trabalho.

Tabela 3- Espécies e respectivos vetores e hospedeiros do gênero *Orbivirus*.

Espécies	Vetores	Hospedeiros
<i>African horse sickness virus</i> (AHSV)	<i>Culicoides</i> spp.	Equídeos, cães, elefantes, camelos, bovinos, ovinos, caprinos, humanos, predadores canívoros
<i>Bluetongue virus</i> (BTV)^{a,b}	<i>Culicoides</i> spp.	Bovinos, ovinos, cervídeos, camelídeos, ruminantes silvestres e alguns predadores carnívoros
<i>Changuinola virus</i> (CGLV)	Phlebotomines	Humanos, roedores e preguiças
<i>Chenuda virus</i> (CNUV)	Carrapatos	Aves marinhas
<i>Chobar Gorge virus</i> (CGV)	Carrapatos	Morcego
<i>Corriparta virus</i> (CORV)	Mosquitos	Humanos e roedores
<i>Epizootic hemorrhagic disease virus</i> (EHDV) ^b	<i>Culicoides</i> spp.	Bovinos, ovinos, cervos, camelos, lhamas, ruminantes silvestres e marsupiais
<i>Equine Encephalitis virus</i> (EEV)	<i>Culicoides</i> spp.	Equídeos
<i>Eubenangee virus</i> (EUBV)	<i>Culicoides</i> spp., <i>Anopheles</i> spp., <i>Aedes</i> spp.	Marsupiais e bovinos
<i>Great Island virus</i> (GIV)	Carrapatos	Aves marinhas, humanos e roedores
<i>Ieri virus</i> (IERIV)	Mosquitos	Aves
<i>Lebombo virus</i> (LEBV)	Mosquitos	Humanos e roedores
<i>Orungo virus</i> (ORUV)	Mosquitos	Humanos, camelos, bovinos, ovinos, caprinos e macacos
<i>Palyam virus</i> (PALV)	<i>Culicoides</i> spp., Mosquitos	Bovinos e ovinos
<i>Peruvian horse sickness virus</i> (PHSV)	Mosquitos	Equinos
<i>St Croix River virus</i> (SCRV)	Carrapatos	Carrapatos
<i>Umatilla virus</i> (UMAV)	Mosquitos	Aves
<i>Wad Medani virus</i> (WMV)	Carrapatos	Animais domésticos e roedores
<i>Wallal virus</i> (WALV)	<i>Culicoides</i> spp.	Marsupiais
<i>Warrego virus</i> (WARV)	<i>Culicoides</i> spp.	Marsupiais
<i>Wongorr virus</i> (WGRV)	<i>Culicoides</i> spp.	Bovinos e marsupiais
<i>Yunnan orbivirus</i> (YUOV)	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	Hospedeiro desconhecido

*Tabela adaptada de Mertens; Attoui; Mellor (2008) e atualizada; ^aEspécie tipo do gênero *Orbivirus*,

^bOcorrência relatada no Brasil

4.2 *Bluetongue virus* (BTV): características gerais e propriedades biomoleculares

O BTV apresenta elevada variabilidade genética, sendo classificado em diferentes sorotipos, de acordo com a sequência de aminoácidos da proteína VP-2 (capsídeo externo), que está diretamente associada ao relacionamento sorológico. Atualmente, baseado em testes moleculares e de soroneutralização, 27 sorotipos distintos já foram reconhecidos, com a possível adição do sorotipo 28 (isolado no oriente médio) e sorotipo 29 (isolado na África do Sul), que ainda não tiveram suas sequências depositadas no *GenBank* (MAAN et

al., 2011; 2015; 2016), ocorrendo em zonas tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, incluindo África, Américas, Austrália, sudeste da Ásia e Europa. Recentemente, tanto na China quanto na Itália, foram identificados possíveis novos sorotipos de BTV, ambos geneticamente semelhantes aos sorotipos 25, 26 e 27, porém ainda não totalmente caracterizados (MACLACHLAN, 2004; ROY; NOAD, 2006; ROY, 2008; SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008; HOFMANN et al., 2008; CHAIGNAT et al., 2009; SPERLOVA; ZENDULKOVA, 2011; MAAN et al., 2011; ZIENTARA et al., 2014; PULLINGER et al., 2016; SUN et al., 2016; LORUSSO et al., 2016).

As partículas do BTV são constituídas por três camadas proteicas concêntricas denominadas capsídeo externo (*outer capsid*), capsídeo intermediário (*intermediate capsid*) e capsídeo interno (*inner capsid*), as quais envolvem e protegem o genoma viral (Figura 1), que, por sua vez, é constituído de 10 segmentos lineares de dsRNA com tamanho total de cerca de 19.200 pares de bases (pb). O tamanho desses segmentos de dsRNA varia de 3.954 a 822 pb, e são identificados como segmentos de 1 a 10 (Seg-1 a Seg-10) em ordem decrescente de seus respectivos pesos moleculares (Figura 3). O BTV codifica sete proteínas estruturais (*viral proteins*, VP-1 a VP-7) e cinco proteínas não estruturais (*non-structural*, NS1, NS2, NS3/NS3a, NS4 e S10-ORF2) (MERTENS; BROWN; SANGAR, 1984; SPERLOVA; ZENDULKOVA, 2011; RATINIER et al., 2011; STEWART et al., 2015; BELHOUCHE et al., 2011; ICTV, 2016).

O segmento 1 (Seg-1) codifica a polimerase viral (VP-1), que é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela síntese de todos os RNA virais, que atuarão como RNA mensageiros (mRNA) na tradução das diferentes proteínas do vírus. Além da RdRp, o BTV codifica duas outras proteínas com propriedades enzimáticas: VP-4 (codificada pelo segmento 4), que tem a função de adicionar o *cap* nos terminais 5' dos RNA virais; e VP-6 (codificada pelo segmento 9) com a função de helicase (MAAN et al., 2007).

O segmento 2 (Seg-2) codifica a proteína VP-2, que juntamente com a proteína VP-5, codificada pelo segmento 6 (Seg-6), formam o capsídeo externo do vírus. A VP-2 é responsável pelo reconhecimento de receptores na membrana da célula hospedeira, enquanto a VP-5 é uma proteína de fusão que media a penetração do vírus na célula hospedeira. Análises filogenéticas mostraram que os segmentos 2 e 6 do genoma do BTV são os componentes que apresentam as maiores variabilidades genéticas. As sequências de

nucleotídeos do segmento 2 de isolados do BTV permitem a formação de diferentes grupos (clados), de acordo com a variabilidade genética entre os sorotipos, e também podem ser utilizadas para sorotipificar os isolados do vírus (MAAN et al., 2007). Em outras palavras o segmento 2, que codifica a proteína VP-2, é determinante na identificação dos diferentes sorotipos, pois contém a maioria dos antígenos neutralizadores virais que possibilitam a identificação de populações de vírus geneticamente muito semelhantes.

De acordo com análises filogenéticas de sequências de nucleotídeos do segmento 2, os sorotipos do BTV foram agrupados em clados denominados sorogrupos. Membros do mesmo sorogrupo apresentam identidade de sequência de nucleotídeos superior a 66,9%: “A” (BTV-4, -10, -11, -17, -20, -24), “B” (BTV-3, -13, -16), “C” (BTV-6, -14, -21), “D” (BTV-8, -18, -23), “E” (BTV-5 e -9), “F” (BTV-7 e -19), “G” (BTV-12 e -22), “H” (BTV-1), “I” (BTV-2), “J” (BTV-15), “K” (BTV-25 e -27), “L” (BTV-26) (MAAN et al., 2011; ZIENTARA et al., 2014) (Figura 2). Vale ressaltar que membros que fazem parte de um mesmo clado podem apresentar reações cruzadas em testes sorológicos, o que pode dificultar nas interpretações dos resultados de diagnóstico e/ou identificação (esses aspectos serão discutidos no item diagnóstico).

O capsídeo interno e o capsídeo intermediário são formados, respectivamente, pelas proteínas VP-3 (codificada pelo segmento 3) e VP-7 (codificada pelo segmento 7), sendo que essas proteínas (VP-3 e VP-7) são mais conservadas entre os sorotipos do BTV do que as proteínas do capsídeo externo (VP-2 e VP-5). A proteína VP-7 tem sido utilizada como alvo para testes de ELISA para o BTV. Já o segmento 3, em função de ser conservado, é alvo para a detecção das diferentes espécies do gênero *Orbivirus* (ATTOUI et al., 2005; 2009).

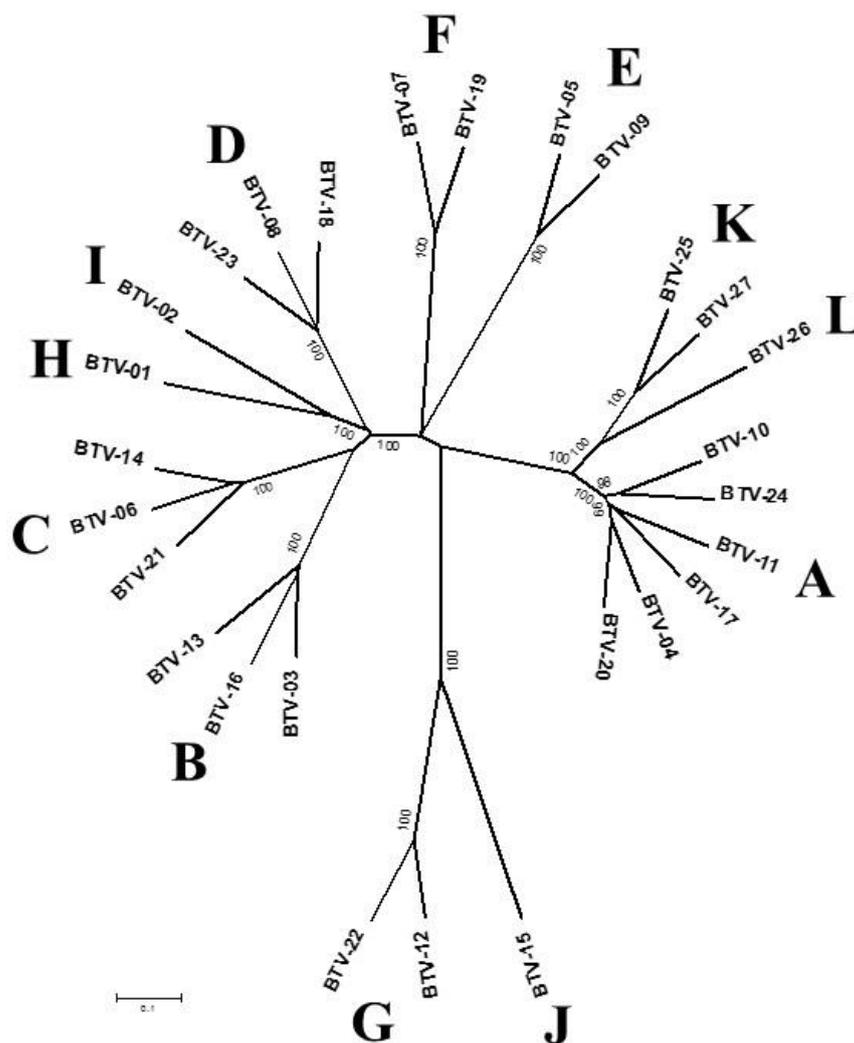


Figura 2- Reconstrução filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos da proteína VP-2 dos 27 sorotipos de *Bluetongue virus* (BTV) por *Neighbor-joining* e análise de *bootstrap* com 1.500 replicações (valores indicados nos ramos) com o programa MEGA 5.2. A barra indica o número de substituições por sítio. As letras maiúsculas (A a L) indicam os sorogrupos (clados) de acordo com Maan et al. (2011) e Zientara et al. (2014).

Cinco proteínas não estruturais foram identificadas em células infectadas pelo BTV: NS1, com 644 kDa codificada pelo segmento 5 (Seg-5), está associada à formação de túbulos; NS2, com 409 kDa codificada pelo segmento 8 (Seg-8), está associada à matriz dos corpos de inclusão; NS3/NS3a, com 256 kDa codificada pelo segmento 10 (Seg-10), está associada com a saída do vírus da célula; e, mais recentemente, duas proteínas, NS4 (codificada pelo segmento 9) e S10-ORF2 (ROY, 1992; FIRTH, 2008). Na Figura 3 podem ser observados, respectivamente, os 10 segmentos genômicos e as proteínas codificadas do BTV. Na Tabela 4 estão relacionadas as características dos 10 segmentos de RNA genômicos e das proteínas do BTV.

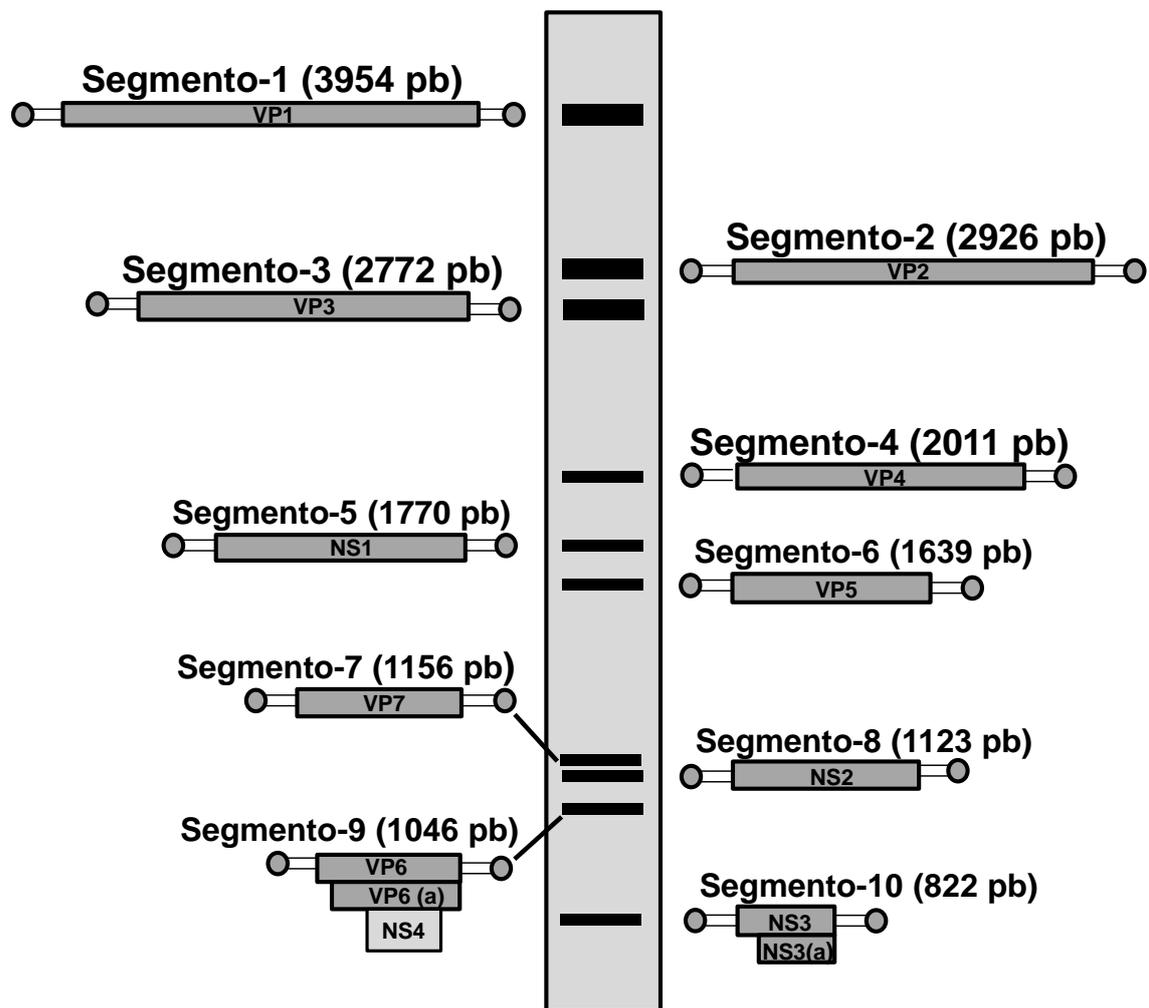


Figura 3- Representação esquemática do padrão de eletroforese (em gel de agarose 1%) dos dez segmentos de RNA lineares (Seg-1 a Seg-10) do BTV, em ordem decrescente de seus respectivos pesos moleculares e as respectivas proteínas codificadas (SILVA, 2017).

Tabela 4- Características dos segmentos genômicos e das proteínas do *Bluetongue virus* (BTV)

Segmento Genômico	Tamanho (pb)	Proteína	Peso molecular da proteína (kDa)	Localização	Função da proteína na célula
Seg-1	3954	VP-1	149	Interior da partícula viral (core)	Polimerase
Seg-2	2926	VP-2	111	Capsídeo externo	Proteína de acoplamento, determinação de sorotipos e epítomos
Seg-3	2772	VP-3	103	Capsídeo interno	Estrutural
Seg-4	2011	VP-4	764	Interior da partícula viral (core)	Enzima que adiciona o <i>cap</i>
Seg-5	1770	NS1	644	Túbulo	Movimento intracelular
Seg-6	1639	VP-5	591	Capsídeo externo	Penetração viral
Seg-7	1156	VP-7	385	Capsídeo intermediário	Proteína de acoplamento a célula de inseto e determinação de sorogrupo
Seg-8	1123	NS2	409	Não estrutural	Seleção de RNA
Seg-9	1046	VP-6	357	Interior da partícula viral (core)	Helicase
Seg-10	822	NS3/NS3a	256	Não estrutural	Auxílio no egresso das partículas virais

Fonte: Adaptada de Mertens; Attoui; Mellor (2008) e atualizada.

4.3 Aspectos relacionados com a transmissão do BTV

4.3.1 O vetor

Amplamente disseminado no Brasil, o mosquito conhecido popularmente como “maruim”, “borrachudo”, “mosquito pólvora” ou “mosquito-do-mangue”, é um díptero hematófago, pertencente à família Ceratopogonidae, gênero *Culicoides*, e atua como vetor biológico do BTV. São conhecidas, na literatura, mais de 1.300 espécies de *Culicoides* (BORKENT; WIRTH, 1997; MELLOR, 2000), mas apenas cerca de 30 espécies foram identificadas como vetores competentes do vírus (MEISWINKEL et al., 2004).

Os *Culicoides* estão distribuídos por todos os continentes, sendo que a principal espécie transmissora do BTV é o *C. imicola*, considerado o vetor mais eficiente na Europa, África e Ásia. Essa espécie foi descrita como vetor competente em casos de LA ocorridos em Portugal, Espanha, Grécia, Chipre, Itália, Israel, Turquia, entre outros países (MELLOR, 1990). Além disso, outras espécies como *C. obsoletus* e *C. pulicaris* apresentam potencial de transmissão na Europa (MEHLHORN et al., 2009). Na América do Norte, *C. variipennis* é o principal vetor do BTV, enquanto que na Austrália os principais vetores do vírus são: *C. waddai*, *C. brevitarsis*, *C. fulvus* e *C. actoni* (MELLOR, 2000). Na América Central e Caribe, *C. insignis* foi a espécie predominante (95%) nas coletas realizadas próximas de criações de ruminantes, sendo isolados os sorotipos BTV-3

e BTV-6 (MO et al., 1994). Em uma área lacustre situada entre a Argentina e o Paraguai, 21 espécies de *Culicoides* foram capturadas, sendo novamente *C. insignis* a mais abundante. Porém, não foi realizada a identificação do vírus (RONDEROS; GRECO; SPINELLI, 2003). No Brasil, apesar da fauna de *Culicoides* ser pouco estudada, em pesquisas realizadas nos Estados do Acre, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Maranhão, e Amapá, *C. insignis* foi identificado como a espécie mais abundante nestas regiões. Apesar da presença do vírus não ter sido detectada no vetor, estas regiões possuem comprovada evidência sorológica da presença do BTV (SILVA et al., 2001; LAENDER, 2002; BARROS et al., 2007; FELIPPE-BAUER et al., 2008; SARAIVA, 2011).

Os *Culicoides* são ubiqüitários e mais frequentemente presentes em áreas quentes, úmidas e alagadas (terrenos alagadiços, lodosos), que são ricas em matéria orgânica e abundantes em hospedeiros dos quais os insetos podem se alimentar. O período de atividade do vetor concentra-se cerca de uma hora antes do pôr do Sol até uma hora depois do nascer do Sol (MELLOR, 2000). O ciclo de vida desses insetos tem duração de duas a seis semanas, é direto e envolve um ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto. O adulto geralmente vive por dez a vinte dias, mas pode sobreviver por até 90 dias em condições mais frias. As fêmeas de algumas espécies de *Culicoides* precisam ingerir uma refeição de sangue de três a quatro dias antes da postura dos ovos e se alimentar em intervalos mais ou menos de quatro dias. Os machos apresentam características morfológicas distintas das fêmeas, e por apresentarem aparelho bucal não apto a sugar sangue, sua alimentação é baseada em sucos vegetais, não sendo atraídos por animais (BIRLEY et al., 1982; MELLOR, 2000; LYSYK; DANYK, 2007; VERONESI et al., 2009).

4.3.2 Transmissão

O BTV é quase sempre transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), portanto, surtos dependem da presença concomitante de insetos vetores competentes e animais ruminantes suscetíveis (MELLOR, 2000). Os *Culicoides* adquirem o BTV quando fêmeas hematófagas ingerem sangue de um hospedeiro virêmico. O vírus se replica no trato digestório e em órgãos alvo secundários, incluindo as glândulas salivares. O intervalo entre a ingestão e a habilidade subsequente para transmitir o vírus é chamado de período de incubação extrínseco e sua duração depende da temperatura, levando cerca de 10 dias a 25°C (WELLBY et al., 1996). A incidência sazonal da LA é restrita às épocas

do ano, nas quais as fêmeas adultas estão presentes (WITTMANN; BAYLIS, 2000). As fêmeas de *Culicoides* requerem pelo menos um repasto sanguíneo para a conclusão de um ciclo ovariano. Dessa forma, o pico de atividade desses insetos está relacionado com seu ciclo reprodutivo. Este fator é relevante na prevalência da LA, podendo o vírus ser transmitido a cada repasto para ruminantes susceptíveis como representado na Figura 4 (MELLOR, 1990; WARD, 1994; LOBATO, 1999; WITTMANN; BAYLIS, 2000).

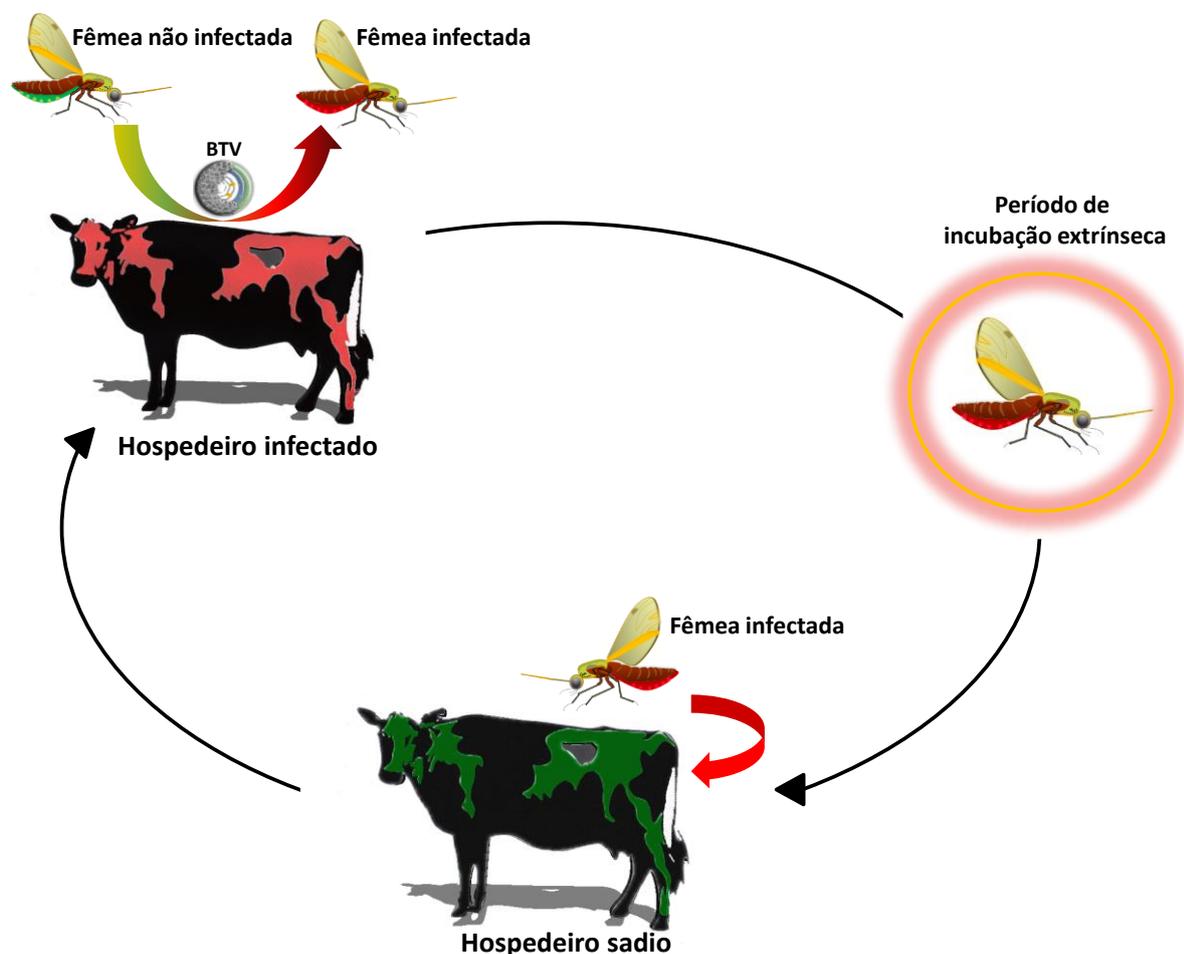


Figura 4- Ciclo simplificado de transmissão do *Bluetongue virus* (BTV) em bovinos com a presença do inseto vetor (fêmeas de *Culicoides* sp.) (SILVA, 2017).

A quantidade de mosquitos infectados pelo BTV dependerá do nível de viremia do hospedeiro, da competência do inseto como vetor e do número de picadas (EUROPEAN COMMISSION, 2014). A viremia é essencial à transmissão do BTV, uma vez que nessa fase da infecção o vírus encontra-se associado às células sanguíneas, principalmente monócitos, linfócitos e eritrócitos (OSBURN, 1994a; 1994b). Dessa forma, o ruminante virêmico serve como fonte de vírus para o vetor e atua como reservatório para a manutenção do vírus (BREARD et al., 2004). A duração da fase virêmica nas diferentes espécies animais tem uma relação direta com a importância de cada espécie na epidemiologia do vírus. Viremias têm sido descritas em períodos de cerca de 50 dias em ovinos e caprinos, de 28 a 41 dias em bisão (*Bison spp.*), e de mais de 100 dias em bovinos (KOUMBATI et al., 1999; CLAVIJO et al., 2002). Apesar da infecção do BTV ser subclínica em bovinos, esses animais são considerados um importante reservatório do vírus em virtude do longo período da fase virêmica e dos altos títulos virais durante esse período (WARD, 1994; WARD; CARPENTER; OSBURN, 1994; BREARD et al., 2004).

4.3.3 Outras formas de transmissão

Na maioria dos casos, os *Culicoides* são responsáveis pela transmissão do BTV, exceto outros em que o piolho do ovino (*Melophagus ovinos*), carrapato *Ornithodoros coriaceus* e mosquitos (*Aedes lineatopennis* e *Anopheles vagus*) podem estar envolvidos na transmissão (mecânica), porém não apresentam papel significativo na epidemiologia da doença, por não ser uma associação biológica constante entre vírus, vetor e hospedeiro (RADOSTITS, 1994).

Estudos confirmaram a transmissão venérea em bovinos, de modo que o sêmen de um touro virêmico pode transmitir o BTV, seja através de monta natural ou inseminação artificial (BOWEN; HOWARD, 1984). Porém, essa é uma forma de transmissão rara e a presença do vírus no sêmen de touros restringe-se ao período de pico da viremia (AFSHAR; EAGLESOME, 1990; OSBURN, 1994a; 1994b; WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006).

A transmissão transplacentária depende da estirpe do vírus e estado imune da fêmea (DARPEL et al., 2009), entretanto foram descritos casos em bovinos (THOMAS;

RANDALL; MYERS, 1986; DESMECHT et al., 2008; DARPEL et al., 2009; SANTMAN-BERENDS et al., 2010), ovelhas (FLANANGAN; JOHNSON, 1995; SAEGERMAN et al., 2011), cabras (BELBIS et al., 2013) e cães (WILBUR et al., 1994). A transmissão oral, apesar de ainda pouco estudada, foi descrita em casos de ingestão de placenta de um feto bovino infectado, e também pelo colostro (MENZIES et al., 2008; MAYO et al., 2010). Além disso, o vírus pode ser transmitido por vacinas vivas atenuadas modificadas (compostas de amostras de sorotipos do VLA com potencial para causar a contaminação de fetos), quando aplicadas em fêmeas gestantes. A possibilidade de morte embrionária relacionada ao VLA tem sido reportada com base em estudos epidemiológicos, em que um aumento do intervalo entre partos (153 - 112 dias) e uma menor taxa de concepção no primeiro serviço foram associados à soroconversão e ao isolamento viral em fêmeas prenhes (WRATHALL et al., 2006). Apesar disso, pouco se sabe sobre a capacidade de transmissão congênita do VLA.

Estudos demonstram que o BTV-26 é facilmente transmitido através da transmissão de contato direto (secreções e aerossóis) entre cabras, este sorotipo foi isolado pela primeira vez em ovelhas no Kuwait (MAAN et al., 2011; BATTEN et al., 2014).

4.3.4 Círculo de hospedeiros e sinais clínicos

O BTV pode infectar todas as espécies de ruminantes (bovídeos, cervídeos e camelídeos). Os sinais clínicos da doença são mais severos em animais selvagens, e mais comumente observados em ovelhas (HOWERTH; GREENE; PRESTWOOD, 1988; DARPEL et al., 2007). A doença pode apresentar desde manifestações subclínicas (assintomáticas) a casos fatais, o que dependerá do sorotipo, estirpe viral, espécie e idade do animal infectado (ELBERS et al., 2008).

Segundo Laender (2002), todas as raças de ovinos são suscetíveis à LA, mas em graus variáveis, ocorrendo frequentemente em raças exóticas introduzidas em regiões tropicais ou em rebanhos nativos localizados próximos a áreas consideradas endêmicas. Os diferentes graus de suscetibilidade parecem estar relacionados às diferentes reações imunológicas de cada raça (WARD; CARPENTER; OSBURN, 1994). No Brasil, algumas raças de ovinos como Lacaune, Texel, Hampshire Down, Corriedale e Santa Inês já foram diagnosticadas com anticorpos contra o BTV (ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al.,

2014). Na América do Sul, raças nativas de ovinos têm alta prevalência de anticorpos, mas raramente apresentam sinais clínicos, o que sugere apresentarem resistência à LA (CLAVIJO et al., 2002).

Os bovinos apresentam um importante papel na epidemiologia da LA, pois possuem prolongada viremia e altos títulos virais sem apresentar manifestação clínicas (TWEEDLE; MELLOR, 2002). Entretanto, em epidemias causadas pelo BTV-8 na Europa, foi observada doença clínica em bovinos (DARPEL et al., 2007; ELBERS et al., 2008). Estudos revelam uma possível preferência de algumas espécies de *Culicoides* por um hospedeiro específico. Diversas espécies de *Culicoides* de comprovada competência na transmissão do BTV, como *C. brevitarsis*, *C. brevipalpis*, *C. wadai* e *C. fulvus*, se alimentam preferencialmente de bovinos (LOBATO, 1999). Além disso, os bovinos apresentam outros fatores de susceptibilidade à infecção pelo BTV como: raça, sexo e idade. Estudos sugerem que as raças de *Bos taurus* são mais suscetíveis à infecção pelo BTV do que as raças de *Bos indicus*, e que estes, por sua vez, são mais suscetíveis do que indivíduos provenientes de cruzamentos entre as espécies. Tem sido observado que a soroprevalência da LA aumenta com a idade, sendo provavelmente um reflexo do maior tempo de exposição ao vetor e, conseqüentemente ao vírus (WARD; CARPENTER; OUSBORN, 1994; GONZÁLEZ; PÉREZ; SINGER, 2000).

No Brasil, provavelmente menos de 1% dos bovinos infectados apresentam manifestação clínica após a infecção (LOBATO, 1999). Quando se observam sinais clínicos nos bovinos, estes são menos graves do que nos ovinos e se caracterizam por febre, salivação, edema dos lábios, corrimento nasal com lesões ulcerativas da língua e cavidade oral. E por ser uma doença que pode apresentar ocasionalmente lesões na mucosa oral e nasal, está incluída na lista de doenças diferenciais de febre aftosa (RIET-CORREA et al., 1996).

Em ovinos, a doença se manifesta de forma crônica ou aguda, podendo apresentar altos índices de mortalidade e um período de incubação de quatro a oito dias. Os principais sinais clínicos da LA são: queda na produção, febre, apatia, hiperemia dos lábios e narinas com salivação excessiva e secreção nasal serosa, mucopurulenta que, após secar, forma uma crosta em torno das narinas. Também são observados frequentemente edema de face e língua, podendo evoluir, nos casos mais graves, para cianose de língua. Hemorragia, conjuntivite, dispneia, diarreia hemorrágica profusa e perda de lã também são sinais

clínicos frequentes. No estágio avançado da doença, os ovinos podem apresentar hemorragia na porção coronária dos cascos, laminite, torcicolo e degeneração muscular, resultando em costas arqueadas e claudicação (BREWER; MACLACHLAN, 1994; TWEEDLE; MELLOR, 2002; DARPEL et al., 2007; KIRSCHVINK; RAES; SAEGERMAN, 2009). A infecção em ovelhas prenhes pode levar à mumificação fetal, aborto e ao nascimento de cordeiros fracos com potenciais defeitos congênitos (hidrocefalia, cisto cerebral e displasia da retina) (MACLACHLAN; CONLEY; KENNEDY, 2000; SAEGERMAN et al., 2011). Ovelhas com infecção crônica podem apresentar outras doenças secundárias, como pneumonia bacteriana (MACLACHLAN; GARD, 2009). Cabras são, normalmente, menos afetadas pelo BTV e raramente apresentam sinais clínicos da doença, que, quando ocorrem, apresentam-se de forma mais branda (DERCKSEN et al., 2007).

4.3.5 Patogênese do vírus da língua azul

Após a introdução do BTV no animal (hospedeiro), por meio da picada do culicídeo, o vírus é transportado para células dendríticas da pele do hospedeiro para a linfa local, que serão os sítios iniciais da replicação do vírus (HEMATI et al., 2009; MACLACHLAN et al., 2009). Posteriormente, as partículas virais propagam-se para a circulação sanguínea, induzindo uma viremia em órgãos secundários, gânglios linfáticos, baço e pulmões (SANCHEZ-CORDON et al., 2010). O vírus se replica em células endoteliais vasculares, macrófagos e linfócitos (BARRATT-BOYES; MACLACHLAN, 1994; MACLACHLAN et al., 2009; DREW et al., 2010), ocorrendo a disseminação por meio dos vasos linfáticos e/ou vasos sanguíneos. Mediadores vasoativos produzidos por células reticulares dendríticas, macrófagos e células endoteliais infectadas pelo vírus contribuem para a extensiva disfunção endotelial e falência vascular que é característico da LA fulminante (PARSONSON, 1990; BREARD et al., 2004). Na viremia precoce, o vírus está associado a todos os elementos do sangue, enquanto em estágios posteriores de viremia o vírus associa-se exclusivamente aos eritrócitos (MACLACHLAN et al., 1990; 2009; MACLACHLAN, 2004). O vírus livre em baixos títulos pode ser encontrado no plasma sanguíneo nas fases iniciais da infecção (MACLACHLAN et al., 1990).

Em bovinos, os surtos são esporádicos, a morbidade é variável e/ou nula. A viremia, nos ruminantes infectados, está altamente associada aos eritrócitos e plaquetas. Devido à

baixa meia vida das plaquetas no sangue, no decorrer da infecção, os vírus ficam associados somente à invaginação dos eritrócitos, permitindo prolongada viremia. Com isso, os anticorpos específicos de BTV são detectados aproximadamente duas semanas depois da infecção natural e podem persistir entre quatro e seis anos (ESCHBAUMER et al., 2010; MAYO et al., 2010).

4.3.6 Epidemiologia da língua azul e sua distribuição no Brasil e no mundo

A epidemiologia da LA é mundialmente classificada em três zonas de infecção: (i) zona endêmica, em que a infecção é comum e geralmente subclínica, com a presença de diferentes sorotipos; (ii) zona epidêmica, em que a doença ocorre em intervalos regulares, influenciados pelas condições climáticas, favorecendo a disseminação do vetor; e (iii) zona incursiva, em que a doença ocorre apenas em intervalos, pois as condições climáticas não favorecem a reprodução do vetor, sendo que os surtos que ocorrem nesta zona estão associados ao carregamento do vetor infectado por meio do vento e subsequente reprodução durante o verão, desaparecendo no outono e inverno (OSBURN, 2004; ROY, 2008).

Tradicionalmente, o vírus está presente nas regiões geográficas entre as latitudes 40°N e 35°S, considerada área de abrangência dos vetores (RODRIGUEZ-SANCHEZ et al., 2008; WILSON; MELLOR, 2009). Na América do Norte e China, a propagação do vírus atinge áreas localizadas a 50°N (MELLOR, 2000).

A transmissão do BTV é influenciada tanto pela distribuição e biologia de insetos vetores como também pelo clima, sendo que diferentes estirpes do vírus são perpetuadas dentro de distintos ecossistemas e em regiões geográficas separadas por diferentes espécies de vetores. Todos os segmentos do genoma do BTV mostram significativas variações nas sequências de nucleotídeos, que parcialmente se correlacionam com as origens geográficas do vírus. Isso sugere que o surgimento inicial de sorotipos do BTV foi seguido por um período significativo de isolamento geográfico, permitindo sucessivas mutações e o surgimento de gerações de linhagens do vírus geograficamente distintas (“topotipos”) (MAAN et al., 2007; 2010). Tais observações têm sido possíveis pela aplicação de técnicas moleculares de genotipagem, que proporcionaram mais dados sobre a epidemiologia do BTV e sobre a extensão da sua evolução. Contudo, estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado que a recente emergência de LA, por exemplo, no continente europeu,

coincide com mudanças climáticas, que aparentemente acarretaram no aumento tanto da distribuição quanto no tamanho das populações dos insetos vetores da região (ROY, 2008).

O BTV está mundialmente distribuído, sendo identificado em todos os continentes com exceção da Antártida (GIBBS; GREINER, 1994; MACLACHLAN, 2010). Após o primeiro relato do BTV, em 1924 no Chipre, surtos da doença ocorreram posteriormente em 1943, 1944, 1951, 1965 e 1977, e continuam sendo registrados até os dias atuais. A Europa, nas últimas décadas, tem sofrido com a invasão de distintas estirpes de diferentes sorotipos como BTV-1, -2, -4, -8, -9, e -16, com novas introduções quase todos os anos, resultando na morte de mais de 1,8 milhões de animais (MERTENS; ATTOUI; MELLOR, 2008). O BTV-8, provavelmente originário de países africanos, foi o causador de uma das maiores epidemias, ocorrida em 2006, no norte da Europa, afetando países como Holanda, Alemanha, Bélgica e França. Mais tarde, o sorotipo 8 se espalhou pela Grã-Bretanha, Suíça, Dinamarca e República Checa (SAEGERMAN; BERKVENS; MELLOR, 2008; SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008; HENDRICKX, 2009). Posteriormente, novos surtos de BTV foram relatados na Hungria, Áustria, Suécia e Noruega em 2008 e 2009 (CARPENTER; WILSON; MELLOR, 2009; AGREN et al., 2010; KAMPEN; WERNER, 2010; LEWERIN et al., 2010).

A estirpe do BTV-8 que invadiu o norte da Europa era altamente virulenta. Além disso, apresentava características distintas das estirpes de campo de BTV, relatadas em surtos anteriores, tais como sinais clínicos severos não apenas em ovelhas, mas também em bovinos, e relacionados a casos de transmissão transplacentária (MACLACHLAN, 2010). Em 2008, o BTV-6 foi identificado na Holanda e na Alemanha, e o BTV-11 na Bélgica. Confirmou-se que ambos os sorotipos foram derivados de estirpes vacinais (DE CLERCQ et al., 2009; ESCHBAUMER et al., 2010), provavelmente introduzidas na Europa por meio do uso ilegal de vacinas atenuadas (MACLACHLAN, 2010).

Desde 2000, na Itália, mais especificamente na região da Sardenha, foram identificadas epidemias envolvendo os sorotipos do BTV-1, -2, -4, -8 e -16. Em 2012, ocorreram reinfecções causadas pelos sorotipos BTV-1 e -4. Análises filogenéticas determinaram que o BTV-4, envolvido no surto, tratava-se de uma estirpe recombinante do BTV-1. Foi constatado também que o mesmo BTV-4 é circulante no norte da África (LORUSSO et al., 2013).

Na Índia, a LA é endêmica e existem evidências da circulação de pelo menos 22 sorotipos, sendo que, até o momento, 13 diferentes sorotipos (BTV-1, -2, -3, -4, -6, -9, -10, -12, -16, -17, -18, -21 e -23) foram isolados (CHAND et al., 2015). Embora a Austrália tenha sido considerada inicialmente livre de BTV, em 1978, o vírus foi identificado ao norte do território australiano, e foram isolados os sorotipos BTV-1, -3, -9, -15, -16, -20, -21 e -23, e mais recentemente os sorotipos BTV-7 e -2, respectivamente, em 2007 e 2008, sendo considerada uma grande ameaça ao seu rebanho ovino (MELVILLE, 2004; 2015).

Na América do Norte, o BTV tem sido notificado desde 1952 com uma epidemia causada pelo sorotipo BTV-10 isolado em ovelhas infectadas na Califórnia. Já os sorotipos de BTV-11, -17, -13 e -2 foram isolados no Novo México (1955), Wyoming (1962), Idaho/Flórida (1967) e Flórida (1983), respectivamente, sendo que tais sorotipos agora são considerados endêmicos no território norte americano. Mais tarde, o BTV-1 foi identificado na Louisiana (2004), BTV-3 na Flórida e Mississippi (1999-2006), e os sorotipos BTV-5, -6, -14, -19 e -22 foram isolados na Flórida (2002-2005) (MERTENS; ATTOUI; MELLOR, 2008). Os sorotipos BTV-1, -3, -4, -6, -8, -12 e -17 foram identificados na América Central e no Caribe (MERTENS et al., 2005). Países próximos aos subtropicais como os Estados Unidos têm grandes chances de possuírem rebanhos infectados por doença enzoótica de forma endêmica.

Considerando-se que grande parte do território da América do Sul está localizada em uma área endêmica para a ocorrência de BTV, com temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento dos vetores competentes, evidências sorológicas indicam que o vírus está presente na região, embora a doença clínica não seja observada em bovinos (LOBATO; GUEDES; MATOS, 2015).

Em 1978, foi descrito o primeiro relato de BTV na América do Sul, sendo que foi evidenciada a presença de anticorpos anti-BTV indicando exposição dos animais ao vírus (SILVA, 1978). Estudos sorológicos apontam para a presença do BTV no Peru e no Chile (LOPEZ; NICOLETTI; GIBBS, 1985; TAMAYO et al., 1985; LAGER et al., 2004; MERINO MENA, 2011). No Equador, foi confirmada a infecção por BTV- 9, -13, -18 em bovinos (VERDEZOTO et al., 2017). Na Bolívia, confirmou-se a infecção, mas não foi observada a doença clínica. O Paraguai é classificado como território com suspeita da doença, sem confirmação, enquanto que no Uruguai o vírus ainda não foi reportado (OIE, 2012).

Na Colômbia, a presença dos sorotipos BTV-12, -14 e -17 foi confirmada (HOMAN et al., 1985). Na Guiana, os sorotipos BTV-14 e -17 foram identificados, e no Suriname identificaram-se os sorotipos BTV-6, -14 e -17 (GUMM et al., 1984). Na América do Sul, os únicos países que possuem o BTV isolado e identificado por RT-qPCR e sequenciamento de porções do genoma são: Brasil (BTV-4, -12, -3, -14, -17, -18, -19 e -22), Argentina (BTV-4) e Guiana Francesa (BTV-2, -13 e -17) (CLAVIJO et al., 2002; ANTONIASSI et al., 2010; LEGISA et al., 2013; BALARO et al., 2014; VIAROUGE et al., 2014; OIE, 2016).

No Brasil, em 1980, de um total de 60 bovinos exportados do país para os Estados Unidos, oito desenvolveram anticorpos contra o BTV, identificados por meio da técnica de IDGA. Além disso, observou-se a presença de anticorpos específicos contra os sorotipos 4 e 20, por meio de VN, durante o período de quarentena. A partir de um dos animais, foi isolado o sorotipo BTV-4 (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982).

Em abril de 2001, em Curitiba, no Estado do Paraná, ocorreu o primeiro relato de BTV como doença clínica. Vinte e um carneiros e um bode apresentaram sinais clínicos compatíveis com LA. O Sorotipo BTV-12 foi identificado por meio de teste de VN e posteriormente isolado (CLAVIJO et al., 2002). Em fevereiro de 2002, no Estado do Paraná, surtos consecutivos de BTV ocorreram envolvendo cabras e ovelhas, porém sem a identificação do sorotipo (LAGER et al., 2004; OIE, 2016).

De março a abril de 2009, no Rio Grande do Sul, dois surtos ocorreram em duas fazendas, afetando ovinos de ambos os sexos e de diferentes idades. Os animais apresentavam sinais clínicos sugestivos de LA, sendo posteriormente confirmado o diagnóstico para o BTV-12 por RT-PCR e sequenciamento (ANTONIASSI et al., 2010). De janeiro a abril de 2013, ovelhas leiteiras de uma fazenda em Vassouras no Estado do Rio Janeiro, apresentaram os resultados clínicos e patológicos sugestivos de LA, e por meio de análise molecular foi identificado BTV-4 (BALARO et al., 2014). De janeiro a outubro de 2014, no Estado do Rio Grande do Sul, ocorreram sete surtos afetando ovinos ao longo de nove meses. Os principais sinais clínicos observados foram dispneia com corrimento nasal e laminite. As principais lesões observadas foram pneumonia, hemorragia da artéria pulmonar, e esofagite com úlceras. O BTV-4 foi identificado como sendo o sorotipo envolvido em todos os surtos. Este foi o primeiro relato de BTV-4 associado com sinais clínicos neste Estado. Posteriormente, de março a junho de 2015 e 2016, no Estado

do Paraná, como parte de um projeto de pesquisa sobre doenças dos cervídeos na reserva ecológica da empresa Itaipu Binacional, veados (*Mazama nana*) apresentaram sinais clínicos sugestivos de BTV seguido de morte. As amostras foram testadas por isolamento viral, RT-qPCR e sequenciamento, sendo identificados, pela primeira vez, os sorotipos BTV-3, -14, -18, -19 e -22 no território brasileiro (OIE, 2016). O BTV-17 foi isolado pela primeira vez no Brasil de ovelhas infectadas no Estado do Rio Grande do Sul, e teve sua sequência completa depositada no *GenBank* (MATOS et al., 2016).

Todos os relatos de detecção de BTV (Figura 5) citados ocorreram predominantemente em períodos quentes e úmidos, de modo que estas condições climáticas podem favorecer a reprodução dos insetos vetores e consequentemente a infecção pelo BTV. Desde o primeiro relato de BTV no Brasil, vários levantamentos sorológicos, incluindo diferentes espécies de ruminantes domésticos e selvagens, têm evidenciado a presença de reações positivas para o BTV em diversos Estados brasileiros, como: Paraíba (MELO et al., 2000), Pará (MARTINS et al., 2011), Minas Gerais (CASTRO et al., 1992; LOBATO et al., 2001; KONRAD et al., 2003), São Paulo (VENDITTI, 2009; NOGUEIRA et al., 2009; BERNARDES, 2011; NOGUEIRA et al., 2016), Paraná, Santa Catarina (LAGER, 2004), Rio Grande do Sul (COSTA, 2000; COSTA et al., 2006), Mato Grosso do Sul (TOMICH et al., 2009), Tocantins (NEGRI FILHO et al., 2016) e Pernambuco (MAIA et al., 2016), porém, não foram observados sinais clínicos nos animais.

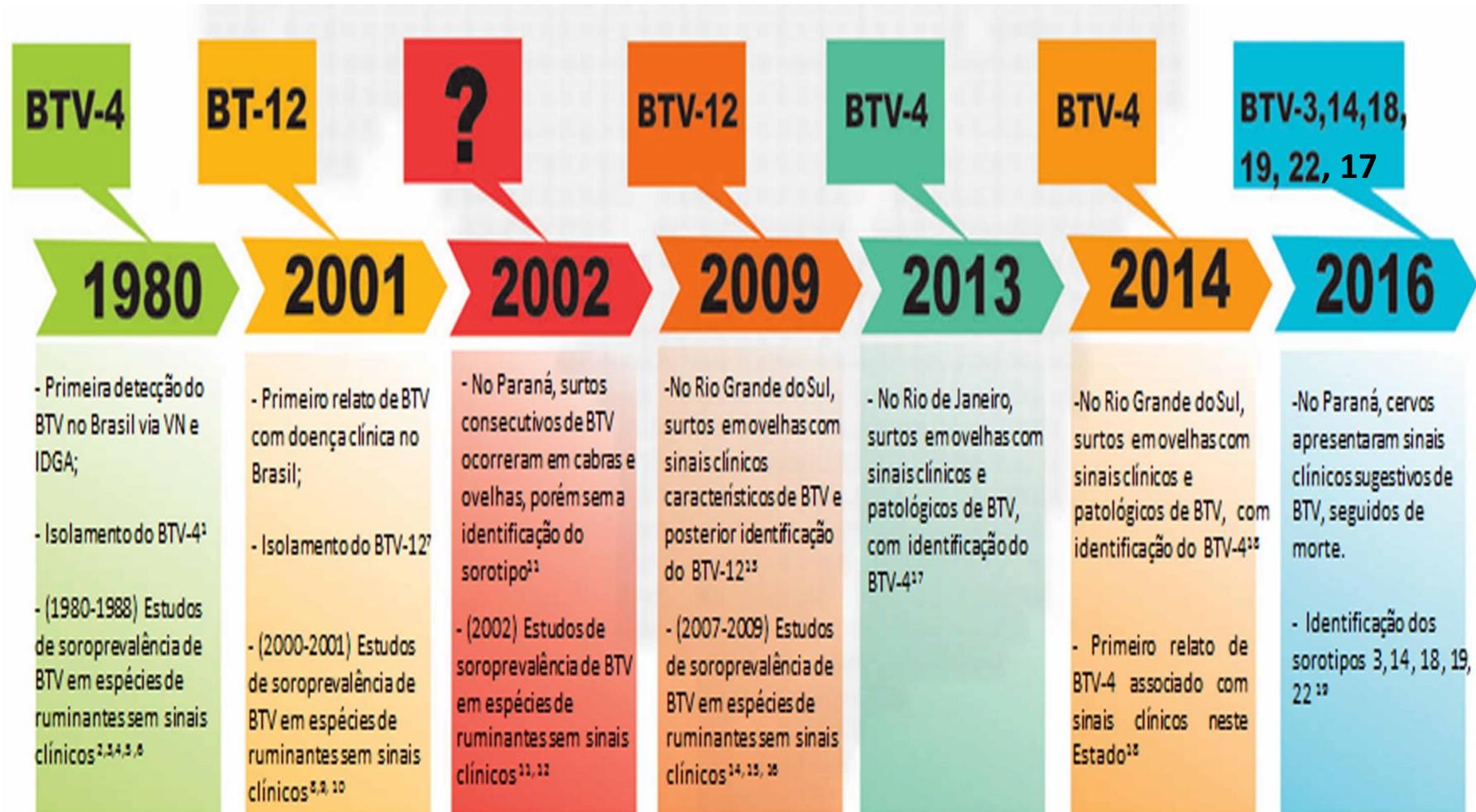


Figura 5 - Linha do tempo com a relação dos principais fatos relacionados à ocorrência e detecção do BTV no Brasil. ¹Groocok; Campbell (1982); ²Moreira; Silva; Viana, 1980; ³Cunha; Souza; Teixeira, 1982; ⁴Abreu, 1982; ⁵Cunha; Souza; Passos, 1987; ⁶Cunha; Souza; Teixeira 1988; ⁷Clavijo et al., 2002; ⁸Costa, 2000; ⁹Melo et al., 2000; ¹⁰Lobato et al., 2001; ¹¹Silva (2001); ¹²Silva (2002); ¹³Antoniassi et al., 2010; ¹⁴Nogueira et al., 2008; ¹⁵Alves et al., 2009; ¹⁶Venditti, 2009; ¹⁷Balaro et al., 2014; ¹⁸Guimarães et al. (Dados não publicados); ¹⁹OIE (2016).

4.4 Diagnóstico

Ao longo dos anos, o conhecimento sobre o BTV foi cada vez mais aprofundado e aprimorado, sendo que, atualmente, diferentes técnicas sensíveis e específicas são utilizadas para a detecção do vírus, sendo extremamente útil na vigilância epidemiológica da doença.

Os sinais clínicos do BTV podem ser facilmente confundidos com os de outras doenças que afetam ruminantes, tais como: febre aftosa, febre catarral maligna, fotossensibilização, intoxicação por plantas, varíola ovina, rinotraqueíte infecciosa, diarreia viral bovina, estomatite papular bovina e doença hemorrágica epizootica. Por isso, o diagnóstico diferencial dessas doenças é fundamental para a confirmação da presença do BTV (TWEEDLE; MELLOR, 2002; WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008; SAVINI et al., 2011).

O diagnóstico clínico de LA pode ser baseado em sinais clínicos *post-mortem*, e confirmado por exames laboratoriais, sendo a detecção realizada por meio de métodos moleculares ou isolamento viral. As amostras selecionadas para a análise podem ser: sangue com anticoagulante, soro e amostras de tecido colhidas *post-mortem* como baço, linfonodo, medula óssea, língua, fígado, coração, cérebro, além de fetos abortados (AFSHAR, 1994; TWEEDLE; MELLOR, 2002).

O método mais sensível para o isolamento do vírus consiste na inoculação do material suspeito em ovo embrionado de galinha (OEG) com 9 a 12 dias, sendo a via intravenosa a mais indicada. Em casos de amostras de sangue com baixo título viral, a inoculação em ovelhas pode ser uma boa alternativa. O vírus pode ser isolado em vários tipos de linhagens celulares de mamíferos [BHK-21 (*Baby hamster kidney cell*), VERO (*African green monkey kidney*), CPAE (*Calf Pulmonary Artery Endothelial Cell*)] e de insetos (KC – derivada de *Culicoides sonorensis*, e C6/B6 de *Aedes albopictus*) (WECHSLER; MCHOLLAND; TABACHNICK, 1989; MECHAM, 2006).

A identificação dos sorotipos, por sua vez, pode ser obtida por meio de sequenciamento da ORF da VP-2 (presente no Seg- 2). Recentemente, Maan et al. (2016) desenvolveram e validaram *primers* e sondas específicas para a identificação de 27 (+1) sorotipos de BTV, tendo como alvo o seg-2, por meio de RT-PCR quantitativa (sorotipo-específica). O emprego desta técnica consiste em uma alternativa rápida, sensível e específica na detecção e

identificação do vírus. Para a detecção do BTV em amostras clínicas (sangue e tecidos) e culturas de células infectadas, a RT-PCR têm sido utilizada com *primers* específicos para anelamento na ORF NS-1, ou com *primers* universais desenhados para regiões altamente conservadas da ORF S7. Um teste altamente sensível baseado em RT *nested*-PCR para a detecção de BTV no inseto vetor foi também desenvolvido com base em sequências da ORF NS-1 (WILSON; MELLOR, 2009). Vale ressaltar que a RT-PCR com *primers* desenhados para anelamento na ORF NS-1 tem sido um dos testes oficiais, recomendado pela OIE, para diagnóstico do BTV em animais que serão transportados e/ou comercializados entre diferentes países (OIE, 2016). Nos últimos 5 anos, diversos trabalhos foram publicados na literatura mundial envolvendo a utilização de RT-PCR em tempo real, tanto para a detecção quanto para a sorotipagem do BTV (VANBINST et al., 2010; LEBLANC et al., 2010).

Recentemente, um teste de diagnóstico baseado em amplificação de DNA à temperatura constante (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*, LAMP), a partir de sangue, foi desenvolvido para a detecção da porção genômica correspondente à ORF NS-1 (MOHANDAS, 2015). Outras técnicas baseadas em eletroforese dos segmentos de dsRNA genômicos do BTV também são utilizadas, tanto em géis de agarose como em géis de poliacrilamida (RNA-PAGE), que permitem a separação e visualização dos 10 segmentos de RNA do BTV (RAMAKRISHNAN et al., 2005).

Além da detecção dos antígenos, anticorpos (sorogrupo-específico) contra o BTV podem ser detectados por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de competição (c-ELISA), ELISA indireto (i-ELISA), e imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Tais métodos de diagnóstico indireto utilizam como alvo as proteínas VP-3 (codificada pelo seg- 3) e VP-7 (codificada pelo seg- 7), que, por serem mais conservadas entre os sorotipos do BTV (do que as proteínas do capsídeo externo - VP-2 e VP-5), são determinantes na identificação das espécies do gênero *Orbivirus*. A técnica de IDGA tem sido deixada de lado por alguns laboratórios, por não permitir a distinção do BTV dos outros *Orbivirus* (vírus da Doença Equina Africana, vírus da Doença Hemorrágica Epizootica, Vírus da Encefalite Equina e o Vírus Palyam) (ATTOUI et al., 2005; 2009). Outros testes de diagnóstico baseados no reconhecimento antígeno-anticorpo, tais como imunofluorescência (IF), teste de fixação do complemento (FC), inibição de hemaglutinação (IH), podem ser utilizados, porém não para o diagnóstico rotineiro do BTV (OIE, 2012).

A virusneutralização (VN) foi a principal técnica empregada neste trabalho. Dada a sua sensibilidade e especificidade, a VN é recomendada pela OIE como técnica padrão (*gold standard*) na quantificação e identificação de anticorpos específicos contra o BTV (OIE, 2012). O princípio deste teste diagnóstico é simples, e se assemelha às interações entre anticorpos e vírus que ocorrem *in vivo*. Porém, em algumas situações como, por exemplo, no caso de vírus como o BTV, que apresenta elevada variabilidade (com mais de uma dezena de sorotipos), a sua interpretação pode ser complexa devido à ocorrência de reações cruzadas. No caso do BTV, o alvo (antígeno) é a proteína VP-2, que além de ser responsável pelo reconhecimento dos receptores (epítomos) na membrana da célula hospedeira, em função da sua variabilidade, é utilizada na determinação dos diferentes sorotipos via VN (MAAN et al., 2007). Esta técnica permite o reconhecimento, principalmente, da classe específica de anticorpos imunoglobulina G (IgG), responsáveis pela resposta imune secundária ou de memória. A VN consiste em uma reação *in vitro* o, resumida na interação entre um vírus-padrão, previamente quantificado, e anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo (ou outros fluidos corporais que possam conter anticorpos). A mistura (soro+vírus) é submetida a diluições crescentes do soro com uma quantidade constante de vírus, geralmente 100-200 Doses Infectantes em Cultura de Célula 50% (DICC₅₀). Em seguida, a mistura é incubada por aproximadamente 1 hora, sendo que, nesta etapa, os anticorpos presentes no soro neutralizam o vírus-padrão. Após esse período, são adicionadas as células de cultivo. A mistura (soro+vírus+célula) é incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por no mínimo 48 horas, até a leitura dos resultados. Caso o soro testado contenha anticorpos neutralizantes específicos, os vírus (principalmente a proteína do capsídeo externo VP-2) são bloqueados pelos anticorpos, impedindo a interação do vírus com os receptores celulares. Os resultados da VN são analisados em microscópio de luz, sendo visualizada a inibição do efeito citopático padrão (ECP), ou seja, as células permanecem íntegras e bem confluentes quando ocorrer interação vírus-anticorpo, o que significa a presença de anticorpos do vírus na amostra analisada. Ao contrário, na ausência de anticorpos neutralizantes específicos no soro testado, os vírus-padrão não serão neutralizados e, portanto, infectarão as células, induzindo alterações morfológicas visíveis nas células (ECP), sendo esta amostra considerada não reagente ao vírus. É importante lembrar que, antes de realizar a VN, o soro a ser testado deve ser submetido à inativação do sistema (cascata) complemento, por meio de incubação em banho-maria à temperatura de 56°C por 30 minutos. Este procedimento é fundamental para o sucesso do teste, pois quando o sistema complemento permanece ativo, ocorre a eliminação dos

complexos Ag-Ac. Neste caso, a não inativação deste sistema levaria à indução de resultados “falsos negativos” (FLORES, 2007).

Testes de VN, embora mais sensíveis e específicos que os demais testes sorológicos, têm a desvantagem de serem trabalhosos e consumirem maior tempo para a obtenção dos resultados. Além disso, poucos laboratórios no mundo possuem à disposição um banco de vírus com todos os sorotipos de BTV. A VN é considerada uma técnica de referência para pesquisa de anticorpos, e recomendada para a confirmação dos resultados positivos ou inconclusivos obtidos por ELISA. É uma técnica sensível, específica e quantitativa, o que permite a identificação específica dos sorotipos (OIE, 2012). Como toda técnica diagnóstica, a VN apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de uma estrutura laboratorial adequada, que permita a produção e manutenção dos cultivos celulares, em quantidade e qualidade para suprir a necessidade. Além disso, é uma técnica trabalhosa, de difícil automação e de custo moderado, caso o sistema já esteja instalado. Outro inconveniente é relativo ao tempo de no mínimo quatro dias para a obtenção dos resultados, além da necessidade de um banco de vírus padrão incluindo todos os sorotipos detectados até o momento e devidamente armazenados, que são fundamentais para a execução da técnica (FLORES, 2007).

4.5 Prevenção e Controle

A LA não possui um tratamento específico para os animais infectados, e em alguns casos é indicada a administração de medicamentos anti-inflamatórios e não esteroides (RADOSTITS, 1994; TWEEDLE; MELLOR, 2002).

Sabe-se que é praticamente impossível pensar em eliminar completamente os mosquitos *Culicoides* do ambiente natural. Porém, é possível reduzir as populações dos mosquitos para níveis ineficazes de transmissão. A proteção dos animais em estábulos pode ser melhorada com a colocação de telas, portas e janelas feitas de uma malha fina ou um tecido grosseiro, impregnado com inseticida (RADOSTITS, 1994; CALVETE et al., 2010). A prevenção de ataques de vetor pode também ser realizada por meio do controle de mosquitos adultos com a utilização de inseticidas registrados, aplicados no exterior ou interior de estábulos ou até mesmo diretamente em animais sensíveis (MEHLHORN et al., 2009; SCHMAHL, 2009). Entretanto, o conhecimento da fauna entomológica competente de cada região, bem como

associações ao comportamento dos insetos, como hábitos alimentares (diurno ou noturno), preferência de hospedeiros, características reprodutivas (período necessário para concluir um ciclo de postura), preferência por ambientes internos ou externos (pasto ou estábulos), são fundamentais para aplicação de medidas eficientes de prevenção e controle de vetores.

A imunização profilática por meio de vacinas é uma medida eficaz e muito utilizada em diversos países do mundo para o controle da LA. É importante destacar que a vacinação deve ser sorotipo-específica (BHANUPRAKASH et al., 2009) e, portanto, antes da utilização deve-se conhecer o(s) sorotipo(s) prevalente(s) na região. As vacinas vivas atenuadas têm sido comercializadas e utilizadas com sucesso na China, África do Sul, além de diversos países Europeus (STOTT; OSBURN; ALEXANDER, 1985; MURRAY; EATON, 1996; ODEON; SCHORE; OSBURN, 1997; BHANUPRAKASH et al., 2009). Uma dose de vacina atenuada é suficiente para proporcionar uma boa proteção por, pelo menos, um ano e pode fornecer proteção contra infecção com outro sorotipo de BTV (dependendo do sorogrupo), porém, com a eficiência diminuída (TWEEDLE; MELLOR, 2002). As vacinas vivas atenuadas são consideradas de baixo custo de produção em grandes quantidades, e têm se apresentado eficazes na prevenção da doença clínica da LA (DUNGU; GERDES; SMIT, 2004). No entanto, possuem alguns inconvenientes, por representarem risco de teratogenia se administradas em ovelhas em início de gestação. Também tem sido considerada a possibilidade da ocorrência de recombinação gênica entre cepas do vírus vacinal e de campo, resultando em novos tipos virais, que podem induzir variações nas características conhecidas de virulência, ou expressar novas propriedades antigênicas (BREARD et al., 2004).

Portanto, o uso de vacinas deve ser feito após testes de segurança para avaliar possibilidade de reversão viral e passagem transplacentária do vírus e suas possíveis consequências adversas, antes de serem administradas de acordo a espécie e o sorotipo. Savini (2014) relatou que, em vacina viva modificada, o BTV-2 e BTV-9 foram capazes de cruzar a barreira transplacentária e induzir aborto e má formação dos fetos em bovinos, ovinos e caprinos.

Vacinas inativadas são selecionadas, pois o vírus inativado elimina os riscos de transmissão vetorial, a reversão da virulência e o aparecimento de anomalias fetais (OIE, 2008). Estas principalmente quando administradas em bovinos, podem induzir imunidade com proteção duradoura, sendo que as desvantagens incluem seu elevado custo de produção

(vacinação requer grandes quantidades de antígeno, adjuvante e inativante) e a necessidade de um reforço vacinal (SAVINI et al., 2008; 2009).

A Índia possui um programa de vigilância de BTV realizado por um conjunto de órgãos de pesquisa (*All-India Network Program on Bluetongue*, AINP-BT) e, atualmente, é comercializada uma vacina inativada pentavalente para os sorotipos BTV-1, -2, -10, -16 e -23, que vem mostrando resultados positivos, prevenindo o desenvolvimento da doença clínica em hospedeiros susceptíveis com a redução de sinais clínicos e da duração da viremia (REDDY et al., 2010).

Desde 1970, o *Beatrice Hill Farm* (BHF), órgão governamental australiano, realiza um trabalho de intensa vigilância e monitoramento de BTV na Austrália, por meio de bovinos sentinelas em zonas livres de Orbivírus, pesquisas entomológicas com captura e identificação de espécie de *Culicoides* competentes, estudos com modelos de dispersão da doença, além dos diagnósticos de isolamento, sorologia e molecular (MELVILLE et al., 2015). A proibição imediata da importação de animais provenientes de países com BTV é a medida prioritária, seguida pelo monitoramento de fazendas, incluindo exames clínicos, sorológicos e moleculares, certificando-se de que os animais estejam livres de BTV (SPERLOVA; ZENDULKOVA, 2011).

A importância do BTV e conseqüentemente os riscos de epidemias da LA na Europa, levaram à criação de leis rígidas pela Comissão de Regulação Europeia (EC – N°1266/2007), visando o monitoramento, controle e restrição de trânsito de animais para evitar a circulação dos diferentes sorotipos de BTV. Atualmente, a Europa está dividida em 12 zonas de restrição [F (sorotipo 8), G (sorotipos 1, 2, 4, 16), H (sorotipo não especificado), I (1, 4), J (1), T (1, 2, 4, 8, 16), X (4, 16), Z (1, 16), A2 (1, 2, 16), A3 (4), A4 (1, 4, 8, 16), A6 (1, 4, 16)], que englobam os seguintes países: Portugal (I, J), Espanha (I, A3), Itália (G, I, Z, A3, A6), França (F, T), Áustria (A3), Croácia (I, A3), Hungria (A3), Romênia (A3), Bulgária (A3), Eslováquia (A3), Eslovênia (A3), Chipre (X), Malta (H), Grécia (X, A3, A4) (Figura 6) (EUROPEAN COMMISSION, 2017).

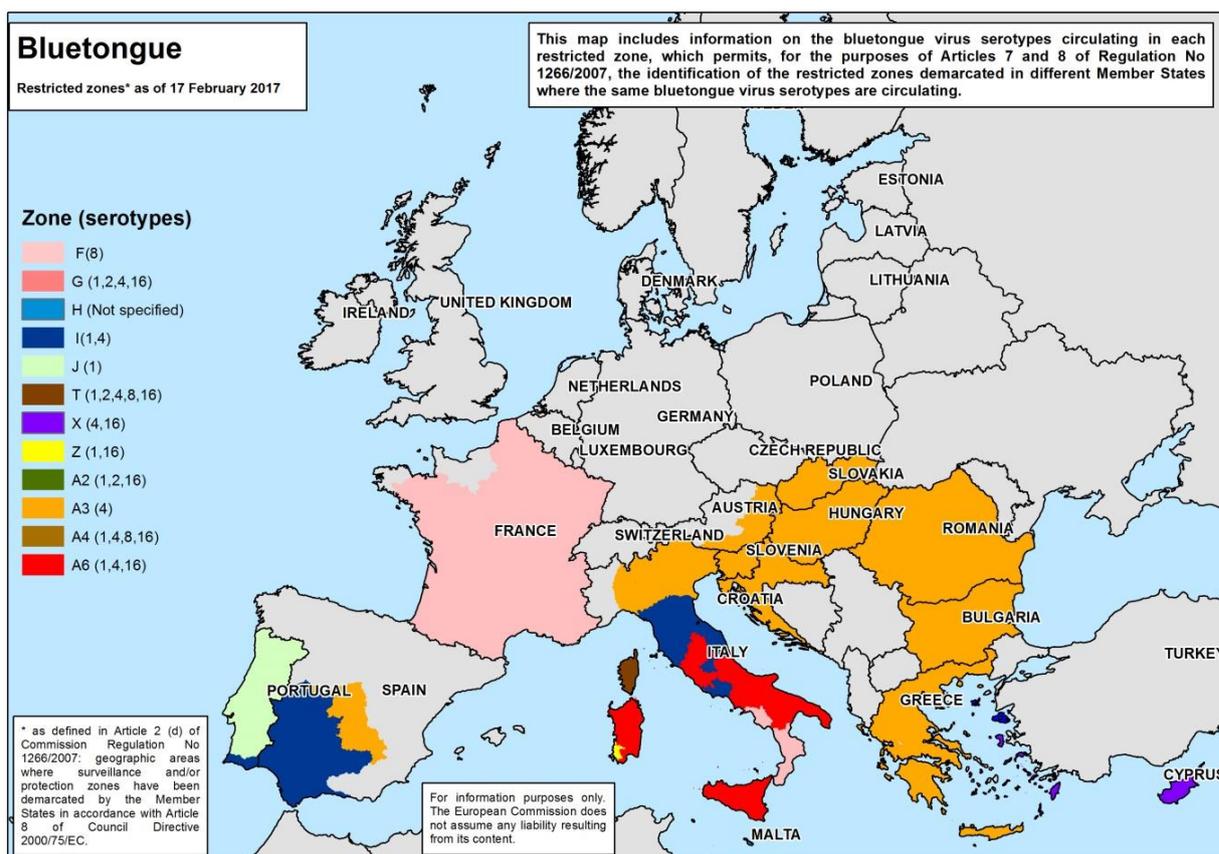


Figura 6 - Circulação de sorotipos de BTV e zonas de restrição europeias, definidas pela Comissão de Regulação Europeia. Mapa atualizado em fevereiro de 2017 e retirado da internet no site https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/bluetongue_en em acesso em março/2017.

No Brasil não existe um programa nacional de vigilância e monitoramento do BTV, e o uso de vacinas ainda é proibido. Isto porque os estudos de BTV no país, até o momento, são incipientes e limitados. Ainda não se sabe quais são todos os sorotipos circulantes, e tampouco quais são as espécies de vetores competentes em cada região. Contudo, o BTV representa uma ameaça constante à sanidade de rebanhos e à economia. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal identificar quais são os sorotipos de BTV circulantes no Estado de São Paulo. Essas informações poderão contribuir para futuros programas de vigilância zoonosológica no país.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem e análise de dados

Esta pesquisa foi conduzida seguindo as diretrizes éticas adotadas pela Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, protocolo 31/07 (Apêndice A).

A presente pesquisa foi realizada a partir do inquérito soroepidemiológico para a caracterização da brucelose bovina no Estado de São Paulo, realizado no período de novembro de 2010 a outubro de 2011. Este inquérito foi desenvolvido de acordo com as diretrizes do Programa Nacional de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) instituído pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2001), e em colaboração com a Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (CDA), serviço veterinário oficial responsável pela defesa sanitária animal no Estado de São Paulo.

A CDA é um órgão da administração pública direta do Governo do Estado de São Paulo, inculcada à Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Possui 40 unidades regionais denominados Escritórios de Defesa Agropecuária (EDAs), que são unidades técnico-administrativas de planejamento, execução e avaliação de atividades de defesa agropecuária. Os médicos veterinários dos EDAs foram responsáveis pela colheita de 12.956 soros de bovinos provenientes de 1.743 propriedades do Estado, e também pela aplicação do questionário epidemiológico nas propriedades amostradas.

O Estado de São Paulo foi subdividido em sete macrorregiões (circuitos) produtoras de bovinos (Figura 7), levando-se em consideração os diferentes sistemas de produção, práticas de manejo, finalidades de exploração, tamanho médio dos rebanhos e sistemas de comercialização. A divisão do Estado em regiões correspondentes a circuitos produtores também levou em consideração a capacidade operacional e logística da CDA/SP, quanto ao trabalho do (EDA) para a realização das atividades de campo, baseando-se nas áreas de atuação de suas unidades regionais (DIAS et al., 2009).

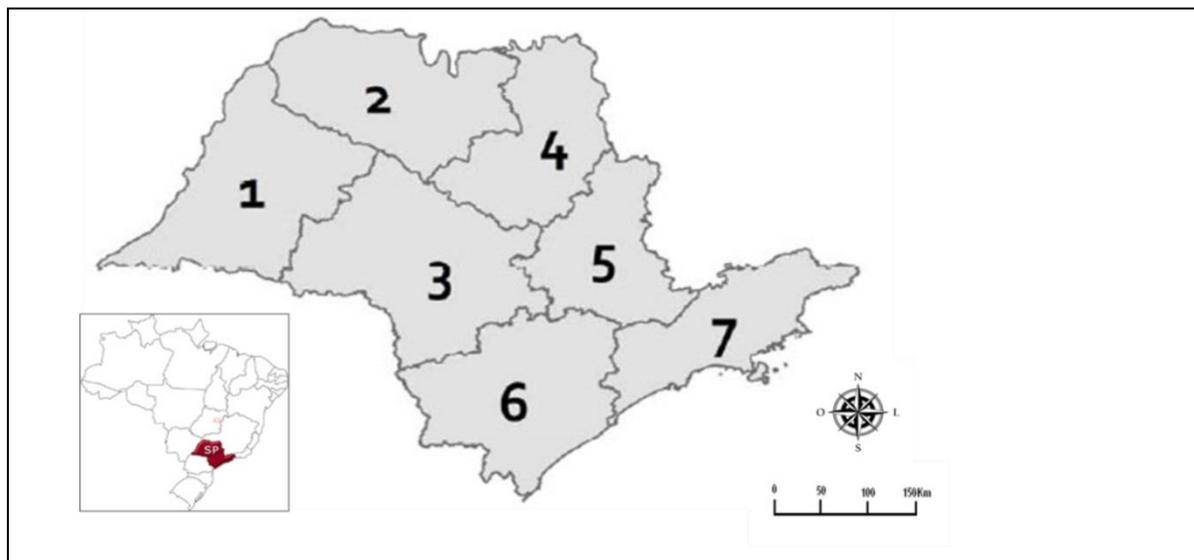


Figura 7- Mapa do Estado de São Paulo subdividido em sete macrorregiões (circuitos) produtoras de bovinos [Adaptado de Dias et al. (2009)].

Da amostragem total do banco de soros de 12.956 animais, referente a 1.743 propriedades, foi escolhido ao acaso um animal por propriedade reagente ao BTV, selecionado pelo método de ELISA competitivo de fase sólida (CFS), fornecido pelo Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA), e posteriormente testado para o BTV-4 por meio da técnica de VN (NOGUEIRA et al., 2016).

Neste estudo, foram utilizadas 1.598 amostras de soros sanguíneos de fêmeas bovinas não vacinadas contra BTV, com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 1.598 propriedades e 603 municípios do Estado de São Paulo, como relacionado na Tabela 5.

Tabela 5- Distribuição do número total de propriedades e animais amostrados, divididos por circuito produtor de bovinos e municípios do Estado de São Paulo.

Circuito Produtor	Municípios	Propriedades amostradas	Animais amostrados
01	93	255	255
02	124	267	267
03	110	256	256
04	74	243	243
05	91	253	253
06	53	179	179
07	58	145	145
Total	603	1598	1598

Em cada propriedade amostrada, foi aplicado um questionário epidemiológico, elaborado para obter informações sobre o tipo de exploração e as práticas de manejo empregadas com o intuito de avaliar os fatores de risco para brucelose e tuberculose (Dias, 2004). Neste estudo, tais informações descritas nos questionários consideradas relevantes para o estudo epidemiológico de BTV, foram utilizadas para avaliar prováveis fatores de risco para a doença no rebanho, tais como: (i) tipo de exploração pecuária (corte leite ou mista); (ii) tipo de criação (confinado, semiconfinado e extensivo); (iii) tipo de ordenha (manual, mecânica ao pé, mecânica em sala de ordenha); (iv) uso de inseminação artificial e/ou monta natural; (v) presença de animais silvestres, incluindo cervídeos; (vi) presença de ovinos/caprinos; (vii) abortamento nos últimos 12 meses; (viii) venda de animais para a reprodução; (ix) abate de adultos; (x) aquisição de bovídeos; (xi) aquisição de bovídeos para reprodução; (xii) aluguel de pasto; (xiii) compartilhamento de itens, tais como acesso à água e sal; (xiv) pastagem em comum com outras propriedades; (xv) presença de áreas alagadas que o gado tenha acesso; (xvi) gado concentrado; (xvii) piquete de parição; (xviii) classificação da propriedade; (xix) assistência veterinária.

5.1.1 Análise de risco

Para a realização do estudo dos fatores de risco associados ao BTV, as variáveis dos questionários epidemiológicos foram submetidas, primeiramente, à análise exploratória de dados pelo teste de qui-quadrado (univariada). As variáveis com nível de significância igual ou superior a 80% ($p \leq 0,20$) foram adicionadas, uma a uma, ao modelo final de regressão logística multivariada (regressão). Foram considerados fatores de risco para o BTV as variáveis com nível de significância superior ou igual a 95% ($p \leq 0,05$) no modelo final. Quando necessário, realizou-se a recategorização dessas variáveis em escala de risco para a doença. Todos os cálculos foram feitos no SPSS para Windows versão 2.2 por meio do software EpiInfo 7.0.

5.2 Sorodiagnóstico

Os procedimentos descritos a seguir seguem os parâmetros determinados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), presentes no “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” (OIE, 2016), e seguidos pelo *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"* (IZSAM), Teramo, Itália.

5.2.1 Cultivo celular

Para a produção das suspensões virais, titulação de vírus e testes de VN, foram utilizadas células da linhagem de epitélio renal de macaco verde africano (*African green monkey kidney*) VERO, fornecidas pelo *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia Romagna “Bruno Ubertini”* Brescia-Itália. A célula armazenada em nitrogênio líquido e/ou freezer -70°C foi rapidamente descongelada em agitação e imersa em banho-maria a 37°C . Em seguida foi retirada toda a suspensão celular e colocada em garrafas de poliestireno de 75 cm^2 próprias para cultivo celulares, devidamente identificadas com a data, linhagem celular e passagem da multiplicação, contendo 30 mL de meio de crescimento, composto por meio essencial mínimo (MEM eagle – Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), acrescido de 20% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), certificado, e livre de anticorpos contra BTV ou outros agentes. A garrafa de cultivo foi mantida em estufa a 37°C a 5% de CO_2 com a tampa ligeiramente aberta. A partir do segundo dia de incubação, observou-se em microscópio de luz a evolução da replicação e a vitalidade da célula. No período de 2-7 dias formou-se a monocamada de célula totalmente livre de contaminação bacteriana e/ou fúngica visível ao microscópio.

5.2.2 Multiplicação celular

Após a total formação da monocamada de célula, o meio de crescimento foi removido cuidadosamente da garrafa para não tocar o tapete celular. Foram acrescentados 2 mL de tripsina-versene (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), agitou-se lentamente por 30 segundos para homogeneizar a solução à monocamada de célula, e em seguida, a solução foi removida com uma pipeta. Novamente foram acrescentados 2 mL de tripsina-versene na garrafa com a monocamada de célula e foi mantida em estufa a 37°C a 5% de CO_2 por cerca de 10 a 15 minutos, até que esta se destacasse por completo.

Para a manutenção da linhagem, o repique das células foi realizado entre três e cinco dias, usualmente na proporção 1:3, utilizando-se solução de Tripsina-Versene, e soro fetal bovino a 10% para a individualização das células. Para obtenção das suspensões de células utilizadas nas reações de VN, o repique foi realizado (como descrito no início deste ítem), sendo que a contagem das células para preparação da diluição necessária (1×10^4 /mL) foi efetuada em câmara de Neubauer (Optik Labor®, Friedrichshofen, Alemanha).

5.2.3 Vírus

Para a realização das reações de VN foram utilizados os padrões virais de referência pertencentes ao banco viral de BTV sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 26 do Departamento de Virologia do IZSAM, Teramo, Itália, mantidos em freezer -20 °C.

5.2.4 Titulação viral

Para determinação do título viral, BTV (1-26) os lotes foram testados em oito diluições seriadas de razão dez (10^{-1} - 10^{-8}) em meio MEM com 1% de antibióticos composto por (penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL Gibco®). Foram distribuídas em microplaca de 96 poços e fundo chato (Falcon®) 50µL das diluições do vírus (oito repetições por diluição) e 50µL de suspensão de células VERO, na concentração de 1×10^4 células/mL. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e umidade controlada. A leitura foi efetuada 96 horas após a incubação com a utilização de microscópio de luz invertido. O cálculo do título viral foi realizado pelo método de Reed; Muench (1938), apresentado na Tabela 6.

Tabela 6- Título viral de 25 sorotipos de BTV testados nas reações de VN, contendo 100 - 300 TCID₅₀ em 50µL (por cavidade)

Sorotipo	Título (LOG₁₀ TCID₅₀/₅₀µL)	Diluição
BTV1	6,63	1:100
BTV2	5,63	1:10
BTV3	5,46	1:10
BTV4	6,00	1:10
BTV5	5,56	1:10
BTV6	5,76	1:10
BTV7	3,63	1:10
BTV8	5,17	1:10
BTV9	7,43	1:100
BTV10	5,83	1:10
BTV11	5,00	1:10
BTV12	5,44	1:10
BTV13	5,56	1:10
BTV14	6,09	1:10
BTV15	5,42	1:10
BTV16	5,60	1:10
BTV17	4,50	1:10
BTV18	5,79	1:10
BTV19	5,00	1:10
BTV20	5,79	1:10
BTV21	3,79	1:5
BTV22	5,57	1:10
BTV23	5,44	1:5
BTV24	5,72	1:10
BTV26	3,65	1:5

5.2.5 Virusneutralização (VN)

As amostras de soro bovino foram previamente submetidas à incubação em banho-maria à temperatura de 56°C por 30 minutos, para a inativação do sistema cascata complemento. Para cada sorotipo testado foi preparada uma placa de controle, contendo o soro controle BTV positivo (S+) e soro controle negativo (S-). Na mesma placa de controle quatro colunas (9-12) foram reservadas para o controle de célula (kc) e controle de atividade viral (kv), como esquematizado na Figura 8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A 1:10							S+	S-	kv t.q.	kv t.q.	kv t.q.	kv t.q.	t.q
B 1:20									kv 1:10	kv 1:10	kv 1:10	kv 1:10	1:10
C 1:40									kv 1:100	kv 1:100	kv 1:100	kv 1:100	1:100
D 1:80									kv 1:1000	kv 1:1000	kv 1:1000	kv 1:1000	1:1000
E 1:160									kc	kc	kc	kc	
F 1:320									kc	kc	kc	kc	
G 1:640									kc	kc	kc	kc	
H 1:1280									kc	kc	kc	kc	

Figura 8 - Esquema da Placa 1 de controle, com solução viral de 100-300 TCID₅₀ (t.q.), onde controle de atividade viral (kv), controle de célula (kc) e controles de soro positivo e negativo (S+ e S-).

Cada reação foi realizada com no máximo 5 placas para cada sorotipo testado (25), totalizando 125 placas por reação. Inicialmente, os soros foram testados a partir da diluição 1:10 até a diluição 1:80, com o intuito de identificar os soros com maiores títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra o BTV, como esquematizado abaixo na Figura 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 1:10	S1	S2	S3	S4	...							Sn
B 1:20												
C 1:40												
D 1:80												
E 1:10	S1	S2	S3	S4	...							Sn
F 1:20												
G 1:40												
H 1:80												

Figura 9- Esquema de placa de soros testados por VN (S1, S2, S3, S4, Sn) realizadas com diluição de 1:10 até 1:80.

Na linha A Figura 9, destinada aos soros, foi adicionado 90µL de meio MEM em cada cavidade e 50µL no restante da placa, com exceção das cavidades destinadas ao controle de célula (Kc) em que foram distribuídos 100µL por cavidade. Foram adicionados 10µL de soro teste (S1...Sn) e de soros controle positivo (S+) e negativo (S-) nas cavidades da linha A

correspondendo a uma diluição (1:10). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de modo que 50µL da linha A foi diluído até a fila D, e 50µL da linha E foi diluído até a linha H sempre descartando 50µL na última linha, para que cada soro fosse submetido a uma diluição seriada de 1:10 até 1:80, em meio MEM.

5.2.6 Preparo do vírus

Os 25 sorotipos de BTV testados foram diluídos em meio MEM, segundo cada título obtido no item (5.2.4), com as respectivas diluições descritas na Tabela 6, de modo que a solução viral para cada um dos sorotipos, obrigatoriamente contivesse de 100 - 300 TCID₅₀ em 50µL (por cavidade). Em uma placa estéril de 96 cavidades, foram preparadas separadamente para cada sorotipo de BTV as diluições em base 10 de controle de atividade viral (kv). Foram adicionados 270µL de meio MEM nas cavidades 1, 2, 3 de uma coluna, e em seguida foram dispensados 30µL da diluição de vírus contendo 100-300 TCID₅₀ em 50µL na cavidade 1 da coluna (diluição 1:10). Em seguida, homogeneizou-se a suspensão da cavidade 1 e retiraram-se 30µL da suspensão viral diluída 1:10, dispensando na respectiva cavidade 2 (diluição 1:100). Homogeneizou-se a suspensão da cavidade 2 e retiraram-se 30µL da suspensão viral diluída 1:100, dispensando na respectiva cavidade 3 (diluição 1:1000). Homogeneizou-se e foram descartados 30µL da suspensão da cavidade 3.

Em seguida, foram adicionados 50µL de suspensão viral contendo 100-300 TCID₅₀ (t.q.) em 50µL em cada cavidade com soro teste, e também na primeira linha destinada ao controle de atividade viral (A9-A12) na placa controle (Figura 8). Adicionou-se também 50µL da suspensão viral diluída 1:10 na segunda linha destinada ao controle de atividade viral (B9-B12), 50µL da suspensão viral diluída 1:100 na terceira fila destinada ao controle de atividade viral (C9-C12) e 50 µL da suspensão viral diluída 1:1000 na quarta linha destinada ao controle de atividade viral (D9-D12). Em seguida as placas foram mantidas por uma hora em estufa a 37°C a 5% de CO₂, para que o anticorpo eventualmente presente no soro neutralizasse o vírus. Ao final da incubação, 100 µL de suspensão de células de linhagem VERO na concentração de 1x10⁴ células/mL foram adicionadas em todas as placas, e imediatamente incubadas novamente por 4 a 7 dias.

A partir do quarto dia de incubação, foi efetuada a leitura das placas em microscópio de luz com lentes objetivas de 10x, 20x, e 40x. Para cada sorotipo de BTV, a leitura da placa foi efetuada quando em todas as cavidades da primeira e segunda linha do controle de atividade viral era possível observar 100% de ECP, e/ou nas cavidades da terceira linha pelo menos

50% de ECP. As placas de sorotipos que não apresentaram estas características foram incubadas novamente e monitoradas ao microscópio por no máximo 7 dias.

Para cada sorotipo de BTV testado, a reação de VN foi validada quando: (i) O controle de célula apresentou monocamada celular íntegra e bem confluyente (sem efeito citopático); (ii) Os soros de controle positivo confirmaram o título esperado (+/-1 logaritmo); (iii) Os soros negativos apresentaram um ECP 100% semelhante ao observados nas cavidades das linhas 1 e 2 do controle de atividade viral; (iv) Os títulos dos soros foram expressos como a maior diluição em que foi possível observar neutralização de pelo menos 75% de atividade viral; (v) Os soros teste foram considerados negativos quando o título viral foi menor que 1:10, confirmando a ausência de anticorpos neutralizantes.

Os soros testados que apresentaram resultados positivos para anticorpos neutralizantes de BTV até a diluição máxima de $\geq 1:80$, foram submetidos a uma nova reação de VN, com diluições seriadas de 1:10 a 1:1280.

5.2.7 Repetição de virusneutralização para BTV-4

Foram realizadas repetições dos testes de VN (método italiano) (5.2.5) de 1172 amostras de soro para o BTV-4 estirpe brasileira parcialmente sequenciada, mas ainda não depositado no *GenBank* (dados não publicados), com o objetivo de comparar os resultados de VN realizados com BTV-4 (estirpe brasileira) e BTV-4 estirpe italiana (Código do *GenBank* - KM233615.1).

5.2.8 Análises de sequências *in silico*

Com o objetivo de avaliar as diferenças observadas nas análises de VN realizadas com estirpes de BTV-4 da Itália e do Brasil, foram feitas comparações entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do BTV-4 italiano (Código do *GenBank* - KM233615.1) e de uma estirpe brasileira. As análises *in silico* foram realizadas por meio dos alinhamentos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos dos 27 sorotipos de BTV com o auxílio dos programas *Clustal X 2.0* (LARKIN et al., 2007) e *GenDoc* (NICHOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997), e as comparações com as sequências

existentes no *GenBank* foram feitas com o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. As análises filogenéticas foram realizadas com o auxílio do Programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando o método *neighbor-joining* com análises de *bootstrap* para 1.000 replicações. Além dos 27 sorotipos de BTV (MAAN et al., 2011; ZIENTARA et al., 2014), nas análises, foram incluídas duas sequências de BTV-4, uma proveniente da Itália (código de acesso no GenBank - KM233615.1) e outra do Brasil (dados não publicados).

5.3 Estudo de fatores climáticos

Com o objetivo de investigar a distribuição espacial dos casos de BTV no Estado de São Paulo e identificar os padrões climáticos locais no período da colheita das amostras, foi realizado um estudo de fatores climáticos. Foram coletados e analisados dados de precipitação e temperatura médias de 26 estações meteorológicas, considerando municípios representativos dos sete circuitos produtores do Estado de São Paulo (Tabela 7), referente ao ano de 2011. Os dados foram obtidos a partir da base de dados meteorológicos históricos do IMET (Instituto de Meteorologia) disponível em (<http://www.inmet.gov.br>). Os mapas de temperatura e pluviosidade foram elaborados com os Softwares Surfer 8.1 e Idris (BARBOSA, 2006). Todos os cálculos de média e somatório foram realizados no Excel (versão 2010), também utilizado na elaboração dos climogramas. Os municípios estudados foram classificados em padrões climáticos, segundo a classificação climática de Koeppen (1948) (ALCARDE et al., 2013) (Tabela 7). Este é o sistema de classificação global dos tipos climáticos mais utilizados em geografia, climatologia e ecologia no mundo.

Tabela 7- Localização das 26 estações meteorológicas consultadas no Estado de São Paulo

Circuito	Município	Latitude	Longitude	Classificação de Köppen ^a
1	Andradina	20° 53'	51° 22'	Aw
1	Araçatuba	21° 12'	50° 25'	Aw
1	Tupã	22° 44'	47° 31'	Aw
1	Presidente Prudente	22° 07'	51° 23'	Aw
2	Catanduva	21° 08'	48° 58'	Aw
2	Jales	20° 16'	50° 32'	Aw
2	São José do Rio Preto	20° 49'	49° 22'	Aw
2	Votuporanga	20° 25'	49° 58'	Aw
3	Assis	22° 39'	50° 24'	Am
3	Avaré	23° 05'	48° 55'	Cwa
3	Ourinhos	22° 58'	49° 52'	Am
4	Franca	20° 32'	47° 24'	Aw
4	Ribeirão Preto	21° 10'	47° 48'	Aw
4	São Carlos	22° 01'	47° 53'	Cwa
5	Campinas	22° 54'	47° 03'	Cfa
5	Mococa	21° 28'	47° 00'	Aw
5	Piracicaba	22° 43'	47° 38'	Cwa
6	Capão Bonito	24° 00'	48° 20'	Cfa
6	Itapetininga	23° 35'	48° 03'	Cwa
6	Itararé	24° 06'	49° 19'	Cfa
6	Registro	24° 29'	47° 50'	Af
6	Sorocaba	23° 30'	47° 27'	Cwa
7	Campos do Jordão	22° 44'	45° 35'	Cfb
7	Santos	23° 57'	46° 20'	Af
7	São Paulo	23° 32'	46° 38'	Cwa
7	Ubatuba	23° 26'	45° 04'	Af

^a**Aw**-tropical chuvoso com inverno seco; **Af**- tropical úmido sem estação seca; **Am**- tropical úmido com inverno seco; **Cfa**- tropical com verão quente sem estação seca no inverno; **Cfb**- verão ameno e chuvoso; **Cwa**- tropical de altitude com chuvas no verão e seca no inverno.

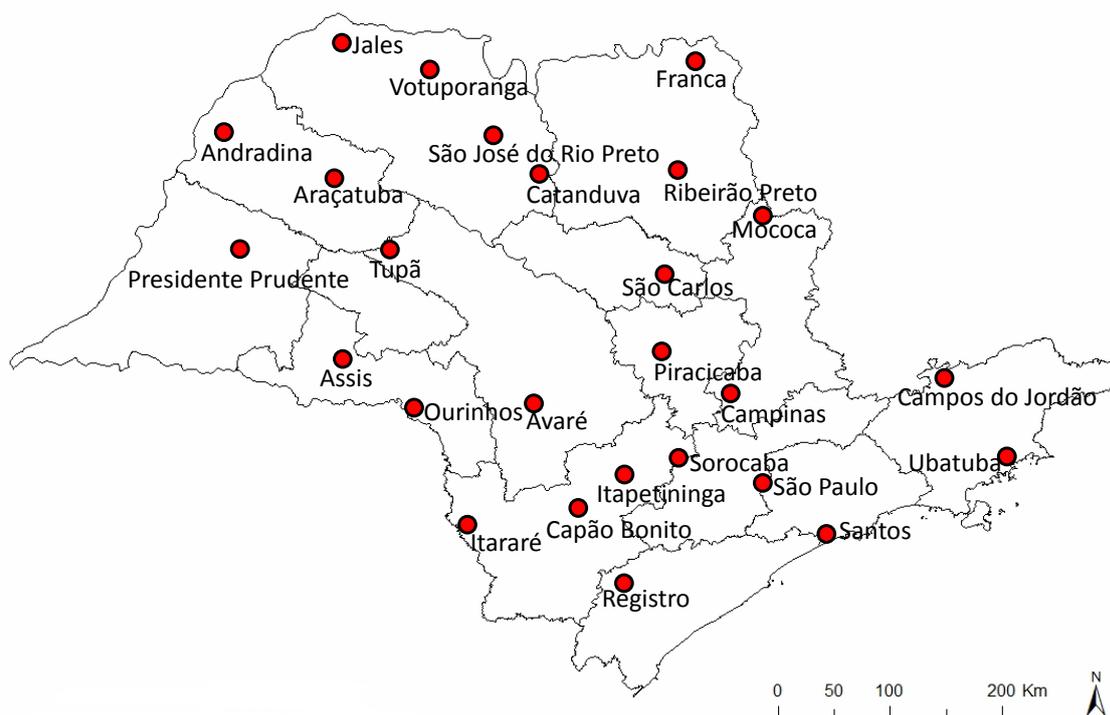


Figura 10 - Mapa do Estado de São Paulo dividido em mesorregiões, com a localização das 26 estações meteorológicas consultadas neste trabalho (elaborado a partir da base cartográfica do IBGE).

5.3.1 Climogramas

Com o objetivo de avaliar se o ano de 2011 (ano da colheita das amostras) foi um ano com condições climáticas consideradas normais (dentro da média) no Estado de São Paulo, foram elaborados climogramas dos municípios de Presidente Prudente (circuito 1), Catanduva (circuito 2), Avaré (circuito 3), Franca (circuito 4), Piracicaba (circuito 5), Sorocaba (circuito 6) e Guarulhos (circuito 7), com valores médios mensais de precipitação e temperatura para cada mês referente ao período de 2006 a 2016 (10 anos), a partir do banco de dados meteorológicos do INMET (<http://www.inmet.gov.br>).

6 -RESULTADOS

Nas reações de VN para 25 sorotipos, foram observados em amostras negativas (A) ECP viral característico de arredondamento celular, formação de sincícios, agrupamento de células, morte e lise celular (MEENAMBIGAI et al., 2006), e também ausência de ECP viral para amostras positivas (B) (Figura 11).

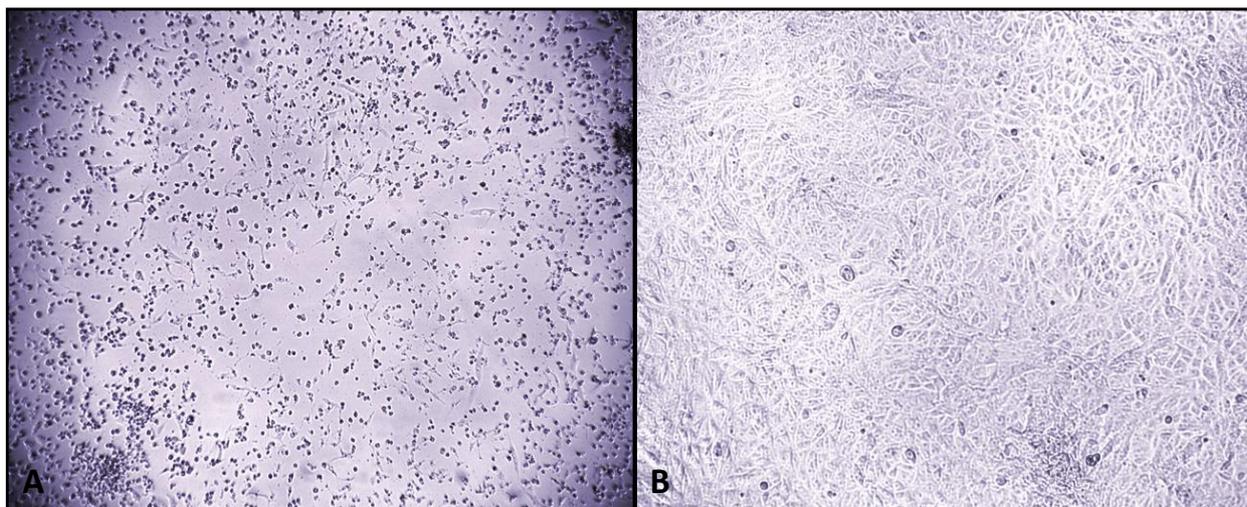


Figura 11- Efeito citopático característico de BTV-2 em soro teste com ausência de anticorpos (A) e células Vero não infectadas (ausência de ECP) em cavidade da placa com soro teste contendo anticorpos anti-BTV-2 (B), visualizado em microscópio invertido (aumento 10x).

Do total de 1.598 amostras de soros, provenientes de 1.598 propriedades de 603 municípios do Estado de São Paulo, testados para 25 sorotipos de BTV (BTV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24 e -26), totalizaram-se 39.950 reações de VN. Nas análises dos resultados de VN, utilizou-se como critério a comparação entre os sorogrupos de BTV, determinados a partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos do segmento-2, e o relacionamento sorológico entre eles (Figura 2), associando aos dados de estudos moleculares recentes de BTV com amostras provenientes das mesmas regiões. No presente estudos, 11 sorotipos de BTV foram considerados presentes no Estado de São Paulo (BTV- 1, -2, -3, -4, -9, -12, -17, -19,- 21,- 22, -26). Na Tabela 8 são apresentados os títulos de anticorpos neutralizantes para os respectivos sorotipos de BTV identificados no Estado.

Tabela 8-Títulos de anticorpos neutralizantes em soro de bovinos do Estado de São Paulo (2011) frente aos sorotipos de BTV

Título Ac	BTV1	BTV2	BTV3	BTV4	BTV9	BTV12	BTV17	BTV19	BTV21	BTV22	BTV26
< 1:10	(75,5%) 1207	(67,2%) 1074	(80,2%) 1282	(74,1%) 1184	(91,5%) 1462	(91,5%) 1462	(75,1%) 1201	(87,7%) 1403	(67,2%) 1074	(86,1%) 1376	(40,6%) 650
1:10	(14,5%) 233	(20,3%) 324	(14,5%) 231	(16,1%) 258	(4,7%) 75	(6,4%) 102	(16,7%) 267	(7,5%) 120	(23,0%) 368	(7,1%) 114	(37,6%) 602
1:20	(5,2%) 83	(8,4%) 134	(3,2%) 52	(6,0%) 96	(1,4%) 23	(0,9%) 11	(5,2%) 84	(2,0%) 33	(6,1%) 98	(2,7%) 44	(14,8%) 238
1:40	(2,1%) 33	(1,9%) 30	(1,2%) 19	(2,2%) 34	(0,6%) 9	(0,4%) 6	(1,7%) 28	(0,4%) 7	(1,1%) 18	(1,9%) 31	(3,5%) 56
1:80	(0,2%) 4	(0,6%) 10	(0,06%) 1	(0,2%) 4	(0,1%) 2	(0,06%) 1	(0,06%) 1	(0,1%) 3	(0,3%) 1	(0,3%) 2	(0,9%) 9
160	(0,06%) 1	0	0	(0,2%) 4	0	0	(0,1%) 2	0	0	0	(0,2%) 4
320	0	0	0	0	0	0	0	0	(0,2%) 4	0	0
640	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0,1%) 3	(0,1%) 2
1280	0	0	(0,06%) 1	2	0	0	0	0	(0,3%) 1	0	0
Tóxico	(1,3%) 20	(0,7%) 10	(0,4%) 7	(0,3%) 4	(0,6%) 10	(0,6%) 9	(0,4%) 7	(0,6%) 11	(1,1%) 19	(0,7%) 12	(0,8%) 14
Insuficiente	(1,1) 17	(1,0%) 16	(0,3%) 5	(0,7%) 12	(1,1%) 17	(0,4%) 7	(0,5%) 8	(1,3%) 21	(0,9%) 15	(1,0%) 16	(1,4%) 23
Total	1598 (100%)										

6.1 Análise por sorotipo de BTV

A seguir estão tabuladas as prevalências aparentes de bovinos reagentes aos sorotipos de BTV por circuito produtor: BTV-1 (Tabela 9), BTV-2 (Tabela 10), BTV-3 (Tabela 11), BTV-4 (Tabela 12), BTV-9 (Tabela 13), BTV-12 (Tabela 14), BTV-17 (Tabela 15), BTV-19 (Tabela 16), BTV-21 (Tabela 17), BTV-22 (Tabela 18) e BTV-26 (Tabela 19).

Tabela 9- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-1 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	85	33,33	[27,71-38,43]
2	267	58	21,72	[17,62-27,64]
3	256	50	19,53	[14,71-24,05]
4	243	48	19,73	[14,11-25,22]
5	253	42	16,60	[11,72-22,12]
6	179	49	27,37	[21,21-33,32]
7	145	22	15,17	[10,50-21,78]
Total	1598	354	22,15	[15,72-27,92]

Tabela 10- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-2 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	83	32,54	[26,22-36,85]
2	267	110	41,19	[35,12-46,69]
3	256	106	41,40	[35,25-47,15]
4	243	74	30,45	[24,19-35,63]
5	253	46	18,18	[13,65-24,02]
6	179	51	28,49	[22,51-33,42]
7	145	26	17,93	[11,48-23,52]
Total	1598	496	31,03	[26,65-37,98]

Tabela 11- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-3 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	28	10,98	[5,45-16,06]
2	267	48	17,97	[10,91-23,02]
3	256	76	29,68	[24,81-34,25]
4	243	48	19,75	[12,40-24,92]
5	253	37	14,62	[9,12-19,52]
6	179	37	20,67	[14,21-25,02]
7	145	29	20,00	[15,72-24,98]
Total	1598	303	18,96	[12,42-24,90]

Tabela 12- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-4 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	55	21,56	[15,25-26,42]
2	267	71	26,59	[21,95-32,25]
3	256	79	30,85	[24,22-35,81]
4	243	52	21,39	[16,41-26,31]
5	253	60	23,71	[15,02-27,78]
6	179	57	31,84	[25,61-35,12]
7	145	24	16,55	[10,59-21,95]
Total	1598	398	24,90	[19,41-29,12]

Tabela 13- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-9 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	18	7,05	[2,51-12,91]
2	267	29	10,86	[4,82-16,72]
3	256	12	4,68	[1,02-10,92]
4	243	15	6,17	[1,25-10,52]
5	253	19	7,50	[2,11-11,15]
6	179	7	3,91	[1,12-8,71]
7	145	9	6,20	[1,51-11,00]
Total	1598	109	6,82	[1,45-11,72]

Tabela 14- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-12 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	25	9,80	[3,40-14,41]
2	267	17	6,36	[1,41-11,71]
3	256	15	5,85	[1,60-12,61]
4	243	22	9,05	[3,81-15,62]
5	253	20	7,90	[2,21-12,00]
6	179	15	8,37	[2,12-16,90]
7	145	6	4,13	[1,50-9,22]
Total	1598	120	7,50	[2,82-12,51]

Tabela 15- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-17 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	57	22,35	[13,01-28,91]
2	267	74	27,71	[21,25-32,41]
3	256	58	22,65	[16,81-28,82]
4	243	50	20,57	[14,12-26,90]
5	253	72	28,45	[22,25-34,71]
6	179	50	27,93	[21,41-33,93]
7	145	21	14,48	[9,22-20,12]
Total	1598	382	23,90	[17,35-29,35]

Tabela 16- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-19 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	69	25,05	[18,15-30,95]
2	267	26	9,76	[4,71-14,50]
3	256	23	8,98	[1,85-14,61]
4	243	12	4,93	[1,05-9,55]
5	253	12	4,74	[1,0-9,85]
6	179	14	7,82	[2,15-13,25]
7	145	7	4,82	[1,12-12,50]
Total	1598	163	10,20	[4,62-15,56]

Tabela 17- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-21 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	94	36,86	[27,61-41,36]
2	267	92	34,45	[27,44-39,85]
3	256	103	40,23	[35,61-46,02]
4	243	66	27,16	[22,21-32,33]
5	253	50	19,76	[14,32-25,55]
6	179	64	35,74	[28,72-41,42]
7	145	21	14,48	[9,72-20,50]
Total	1598	490	30,66	[25,00-36,00]

Tabela 18- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-22 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	63	24,70	[17,51-29,70]
2	267	37	13,85	[8,62-18,22]
3	256	24	9,37	[2,33-15,95]
4	243	23	9,46	[2,42-15,10]
5	253	29	11,46	[4,11-16,54]
6	179	16	8,93	[3,32-14,00]
7	145	2	1,37	[0,08-3,00]
Total	1598	194	12,14	[5,91-18,55]

Tabela 19- Prevalência aparente de anticorpos neutralizantes para o sorotipo BTV-26 (título ≥ 10) por circuito produtor no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Circuito Produtor	Animais		Prevalência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
	Testados	Reagentes		
1	255	137	53,72	[47,22-59,72]
2	267	171	64,04	[58,25-70,81]
3	256	173	67,57	[60,12-73,20]
4	243	108	44,44	[38,25-50,98]
5	253	146	57,70	[51,50-57,70]
6	179	96	53,63	[47,91-59,25]
7	145	80	55,17	[49,75-60,42]
Total	1598	911	57,00	[51,41-63,59]

Resumidamente, as prevalências de sorotipos de BTV no Estado de São Paulo para o ano de 2011 são apresentadas na Tabela 20, em que o sorotipo BTV-26 foi o mais prevalente (57%), seguido pelo BTV-2 (31,03%), BTV-21 (30,66%), BTV-4 (24,90%), BTV-17 (23,90%), BTV-1 (22,15%), BTV-3 (18,96%), BTV-22 (12,14%), BTV-19 (10,20%), BTV-12 (7,50%) e BTV-9 (6,82%).

Tabela 20- Prevalência aparente de sorotipos de BTV no Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Sorotipos	Prevalência (%)	N
BTV-1	22,15	354
BTV-2	31,03	496
BTV-3	18,96	303
BTV-4	24,90	398
BTV-9	6,82	109
BTV-12	7,50	120
BTV-17	23,90	382
BTV-19	10,20	163
BTV-21	30,66	490
BTV-22	12,14	194
BTV-26	57,00	911
100%		

6.1 2 Análise por sorogrupo de BTV

Na análise realizada por sorogrupo de BTV, o sorogrupo L (BTV-26) foi o mais prevalente com 57,00% (IC= 95% [51,2-64,8]), seguido do sorogrupo A (BTV-4, -10, -1, -17, -20 e -24) com 48,80% (IC= 95% [42,5-54,1]), sorogrupo I (BTV-2) com 31,03% (IC= 95% [26,8-38,6]), sorogrupo C (BTV-6, -14, -21) com 30,66% (IC= 95% [23,8-37,7]) conforme apresentado na Tabela 21.

Tabela 21- Prevalência aparente dos sorogrupos de BTV no Estado de São Paulo (2011).

Sorogrupos	Prevalência %	N	*IC 95%
Sorogrupo A (4, 10, 11, 17, 20, 24)	48,80	780	[42,5-54,1]
Sorogrupo B (3,13,16)	18,96	303	[12,6-24,5]
Sorogrupo C (6,14,21)	30,66	490	[23,8-37,7]
Sorogrupo D (8, 18, 23)	0	0	[00,0-00,0]
Sorogrupo E (5, 9)	6,82	109	[1,6-13,3]
Sorogrupo F (7, 19)	10,20	163	[3,4-18,4]
Sorogrupo G (12, 22)	19,64	314	[14,2-26,5]
Sorogrupo H (1)	22,15	354	[16,6-28,8]
Sorogrupo I (2)	31,03	496	[26,8-38,6]
Sorogrupo J (15)	0	0	[00,0-00,0]
Sorogrupo L (26)	57,00	911	[51,2-64,8]

*Intervalo de confiança de 95%

6.1.3 Análise de fatores de risco

Na análise estatística univariada, as variáveis dos questionários que, no teste de qui-quadrado, não mostraram associação significativa quanto ao resultado de sorologia positiva por sorogrupo foram excluídas do modelo final de regressão logística.

Tabela 22- Análise univariada (qui-quadrado) dos rebanhos de bovinos reagentes e não reagentes ao BTV no Estado de São Paulo, no ano de 2011, considerando as variáveis não estatisticamente significativas ($p>0,20$).

Variável	% (reagentes BTV)	% (não reagentes BTV)	Total	<i>p</i>
Tipo de exploração				
Corte	13,0% (83)	87,0% (555)	638	0,95
Leite	13,5% (76)	86,5% (486)	562	
Misto	88,7% (353)	11,3% (45)	398	
Tipo de cria				
Extensivo	12,8% (175)	87,2% (1195)	1370	0,48
Semi-extensivo	12,6% (27)	87,4% (187)	214	
Confinado	14,3% (2)	85,7% (12)	14	
Tipo de ordenha				
Mecânica	12,6% (79)	87,4% (546)	625	0,51
Manual	5,0% (1)	95,0% (19)	20	
Manual e mecânica	16,3% (15)	83,7% (77)	92	
-----	13,6% (109)	86,4% (695)	804	
Inseminação Artificial (IA)				
Não usa IA	12,9% (192)	87,1% (1300)	1492	0,91
Usa IA e touro	88,7% (63)	11,3% (8)	71	
Só usa IA	11,4% (4)	88,6% (31)	35	
Presença de ovinos e caprinos				
Tem	11,3% (33)	88,7% (261)	294	0,40
Não tem	13,1% (171)	86,9% (1133)	1304	
Presença de ani. silvestre				
Tem	11,0% (75)	89,0% (607)	682	0,13
Não tem	14,1% (129)	85,9% (787)	916	
Presença de cervídeos				
Tem	10,0% (22)	90,0% (199)	221	0,51
Não tem	13,2% (182)	86,8% (1195)	1377	
Aborto nos últimos 12 meses				
Não	13,0% (176)	86,9% (1177)	1353	0,35
Sim	9,2% (14)	90,8% (139)	153	
Não sabe	15,4% (14)	84,6% (77)	91	

Aquisição de bovídeos				
Não	8,9% (85)	91,1% (871)	956	0,00
Sim	81,4% (522)	18,6% (119)	641	
Aquisição de bovídeos_reprodução				
Não	11,2% (129)	88,8% (1032)	1161	0,016
Sim	17,2% (75)	82,8% (361)	436	
Venda de reprodutores				
Não	12,7% (177)	87,3% (1219)	1396	
Sim	13,4% (27)	86,6% (175)	202	0,81
Abate_adultos				
Não	11,9% (133)	88,1% (989)	1122	0,19
Sim	14,9% (71)	85,1% (405)	476	
Aluguel de pasto				
Não	12,6% (167)	87,4% (1161)	1328	0,84
Sim	13,7% (37)	86,3% (233)	270	
Pasto comum				
Não	12,6% (173)	87,4% (1201)	1374	0,42
Sim	13,8% (31)	86,2% (193)	224	
Compartilha itens com outras propriedades				
Não	13,0% (173)	87,0% (1167)	1340	0,31
Sim	12,0% (31)	88,0% (227)	258	
Áreas alagadas				
Não	12,7% (140)	87,3% (967)	1107	0,85
Sim	13,1% (64)	86,9% (426)	490	
Gado concentrado				
Não	12,7% (187)	87,3% (1294)	1481	0,37
Sim	14,5% (17)	85,5% (100)	117	
Piquete de parição				
Não	13,5% (169)	86,5% (1087)	1256	0,61
Sim	12,3% (35)	87,7% (250)	285	
Assistência veterinária				
Não	11,4% (122)	88,6% (954)	1076	0,11
Sim	15,7% (82)	84,3% (440)	522	
Compartilha aguada bebedouros com outras propriedades				
Não	12,4% (164)	87,6% (1162)	1326	0,22
Sim	14,7% (40)	85,3% (232)	272	
Classificação da propriedade				
Rural clássica	12,7% (179)	87,3% (1232)	1411	
Assentamento	14,8% (13)	85,2% (75)	88	0,86
Periferia urbana	12,1% (12)	87,9% (87)	99	

Na análise univariada, as variáveis, aquisição de bovídeos ($p=0,00$), aquisição de bovídeos para reprodução ($p=0,016$), presença de animais silvestre ($p= 0,13$), abate de adultos ($p= 0,19$), assistência veterinária ($p=0,11$), estavam associadas com positividade para pelo menos um sorogrupo. As variáveis foram analisadas em conjunto, por meio do modelo de regressão logística, e permaneceu no modelo final somente a variável aquisição de bovídeos ($p=0,00$), com um valor de significância superior ou igual a 95% ($p\leq 0,05$) (Tabela 23).

Tabela 23- Modelo final da regressão logística multivariada de fatores de risco (Odds Ratio) para a BTV em bovinos do Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Variáveis	Casos	Expostos	OR	IC (95%)	<i>p</i>
Aquisição de bovídeos	204	1394	2.183	[1.619-2.945]	0,00

Foi, portanto, considerado fator de risco para o BTV somente a variável aquisição de bovídeos, indicando que em propriedades em que bovídeos são adquiridos (provenientes) de outras regiões, apresentam chance de 2,183 vezes maior de terem seus rebanhos infectados pelo BTV.

6.1.4 Repetições de virusneutralização para o BTV- 4

As repetições dos testes de VN realizados com BTV-4 (isolado brasileiro) e BTV-4 (isolado italiano) revelaram diferenças nos resultado, que podem ser observadas na Tabela 24.

Tabela 24- Comparação de três reações de virusneutralização quanto aos títulos de anticorpos na escala logaritma de base 10 frente ao BTV-4 (isolado brasileiro) e BTV-4 (isolado italiano) em amostras de soro de fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses do Estado de São Paulo, no ano de 2011.

Título (log₁₀)	BTV-4 Brasil (Nogueira et al., 2016)	BTV-4 Brasil (Método Itália)	BTV-4 Itália
0	171 (14,59%)	150 (12,79%)	865 (73,80%)
1	268 (22,86%)	146 (12,47%)	199 (16,97%)
1,3	248 (21,16%)	267 (22,78%)	65 (5,54%)
1,6	246 (20,98%)	293 (25%)	26 (2,26%)
1,9	130 (11,09%)	193 (16,48%)	6 (0,5%)
2,2	67 (5,75%)	85 (7,25%)	4 (0,34%)
2,5	28 (2,38%)	32 (2,73%)	0
2,8	14 (1,19%)	6 (0,5%)	0
3,1	0	0	1 (0,08%)
Tóxico	0	0	3 (0,25%)
Insuficiente	0	0	3 (0,25%)
Total	1172 (100%)	1172 (100%)	1172 (100%)

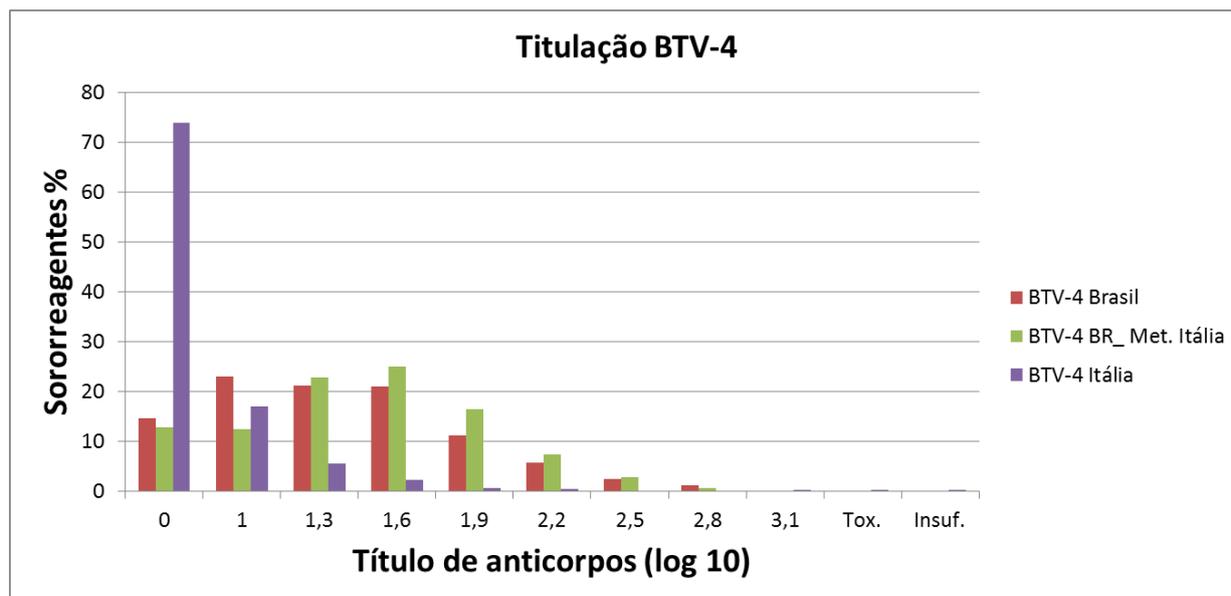


Figura 12- Comparação de três reações de virusneutralização frente ao BTV-4 (isolado brasileiro) e BTV-4 (isolado italiano) em amostras de soro de fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses do Estado de São Paulo, no ano de 2011, (legenda- BTV-4 Brasi, BTV-4 Brasil- VN método italiano, BTV-4 Itália).

6.1.5 Análises *in silico*

As análises filogenéticas, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos deduzidos, confirmaram a identidade dos isolados italiano e brasileiro como pertencentes ao sorotipo 4, formando um clado juntamente com outro isolado de BTV-4 proveniente da África do Sul (Figura 13).

Nas análises *in silico*, diferenças foram observadas entre as sequências de aminoácidos da proteína VP-2 (*outer capsid*) de isolados de BTV-4 provenientes do Brasil (BTV_4_S2) e Itália (BTV_4_Ital) (Figura 14). Essas diferenças podem ter reflexo na estrutura secundária da proteína, afetando aspectos biológicos e moleculares no ciclo infeccioso do vírus, e também podendo interferir alterando o reconhecimento antígeno-anticorpo em testes sorológicos. Nos testes de VN, por exemplo, realizados neste estudo, verificaram-se diferenças de títulos de anticorpos nas reações quando foram analisadas amostras de soro provenientes do Brasil contra isolados de BTV-4 italianos e vice-versa.

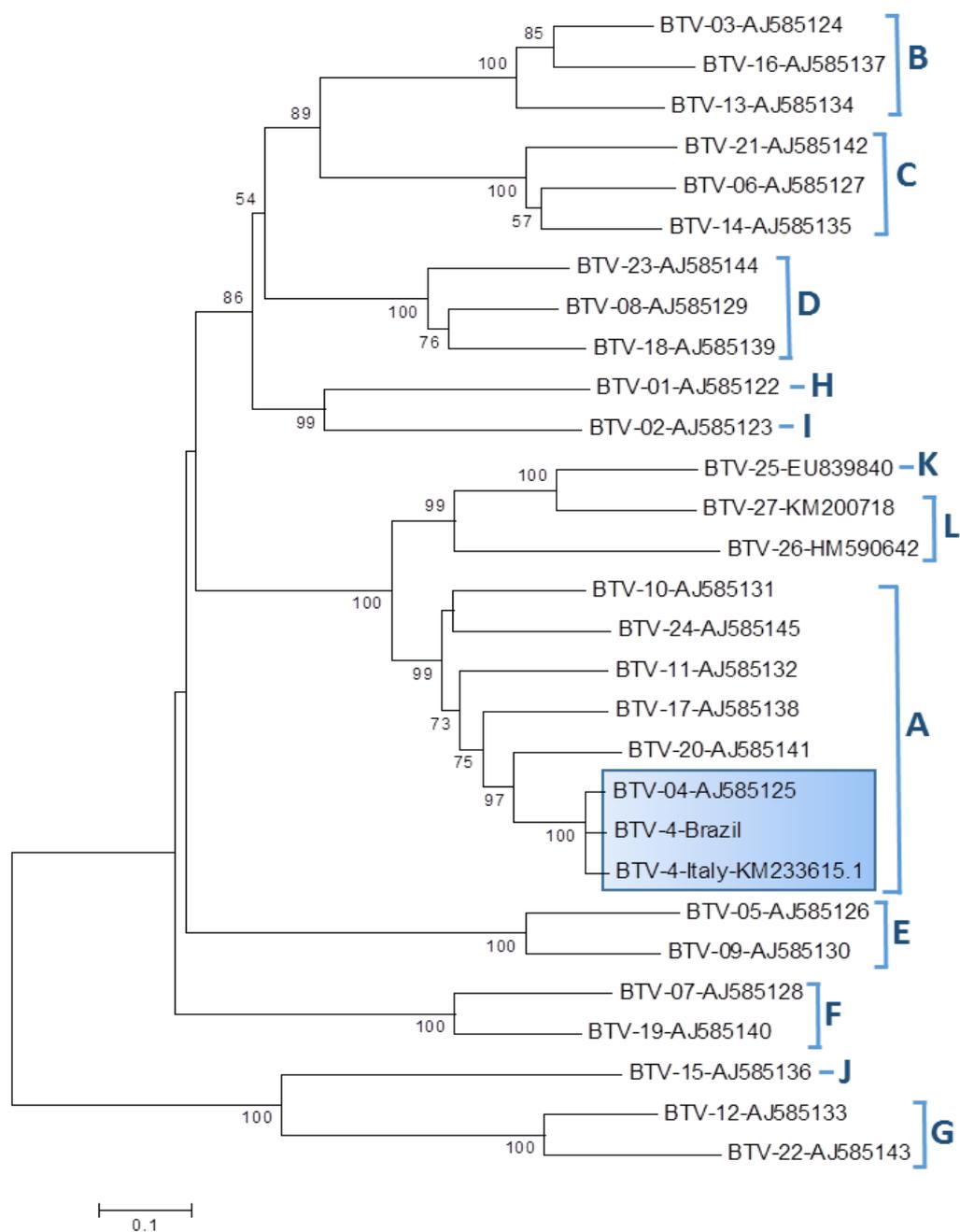


Figura 13- Árvore filogenética obtida com o auxílio do Programa MEGA 6.0, utilizando o método de *Neighbor-Joining*, do alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos da proteína VP-2 dos diferentes sorotipos de BTV (1 a 27). Foram destacados, no retângulo azul, os isolados de BTV-4 provenientes do Brasil (dados não publicados), Itália e África do Sul, os quais formam um grupo consistente com valor de *bootstrap* de 100%. A barra refere-se ao número de substituições por sítio

```

          *          20          *          40          *
BTV_4_Bras : MEEFVIPVFSEREIPYALINQYPLAIQTVDVKIVDVGHHDLAKIPESDMI : 50
BTV_4_Ital : MEEFVIPVFSEREIPYALINQYPLAIQTVDVRVVDVDDNHNLVKIPESDMI : 50
          MEEFVIPVFSEREIPYALINQYPLAIQTDV--VDVD--H-L-KIPESDMI

          60          *          80          *          100
BTV_4_Bras : DVPRLDIVNALNYKPTRNDGIVVPRLLDITLKAYDDRKSVKNARGVDFMT : 100
BTV_4_Ital : DVPKLDIVSALNYKPTRNDGIVVPRLLDITLKAYDDRKSVKNARGVDFMT : 100
          DVP-LDIV-ALNYKPTRNDGIVVPRLLDITLKAYDDRKSVKNARGVDFMT

          *          120          *          140          *
BTV_4_Bras : DIKWMKWAIDDRMDIQPLKITLDEHYSVNHQLFNCIVKAKTANADTIYYD : 150
BTV_4_Ital : DAKWMKWAIDDRMDIQPLKITLDEHYSVNHQLFNCIVKAKTANADTIYYD : 150
          D-KWMKWAIDDRMDIQPLKITLDEHYSVNHQLFNCIVKAKTANADTIYYD

          160          *          180          *          200
BTV_4_Bras : YFPLEDRVKKCNHTNLELLRSLTIEAFHILQGAAYSLKSNYDLIANSER : 200
BTV_4_Ital : YFPLEDRAKKNHTNLELLRSLTIEAFHILQGAAYSLKSNYDLIANSER : 200
          YFPLEDR-KKNHTNLELLRSLT-IEAFHILQGAAYSLKSNYDLIANSER

          *          220          *          240          *
BTV_4_Bras : ESLEESYPIGSEKQVHLTRRTKIGNSGLSYNRFISSMVQVVVRGKVPDII : 250
BTV_4_Ital : ESLEESYPIGSEKQVHLTRRTKIGNSGLSYNRSISSMVQVVVRGKVPDII : 250
          ESLEESYPIGSEKQVHLTRRTKIGNSGLSYNR-ISSMVQVVVRGKVPDII

          260          *          280          *          300
BTV_4_Bras : RGEITQLNRIRTEWIGASFDRTIRALELCNILSAIGRKMDAHEEPKDE : 300
BTV_4_Ital : RGEITQLNRIRTEWIGASYDRTRIRALELCNILSAIGRKMMDTHEEPKDE : 300
          RGE-TQLNRIRTEWIGAS-DRTRIRALELCNILSAIGRKMD-HEEPKDE

```

Figura 14- Alinhamento parcial dos primeiros 300 aminoácidos da proteína VP-2 (*outer capsid*) de isolados de BTV-4 provenientes do Brasil (BTV_4_Bras – sequência não publicada) e Itália (BTV_4_Ital – código de acesso no GenBank - KM233615.1). Observam-se diferenças de aminoácidos entre os isolados em diversas posições.

A seguir, na Figura 15, está representada a concentração e distribuição de bovinos reagentes aos sorotipos de BTV no Estado de São Paulo, de acordo com os respectivos sorogrupos de (A a L) determinados a partir de análises dos nucleotídeos do segmento -2 de acordo com MAAN et al. (2011), ZIENTARA et al. (2014).

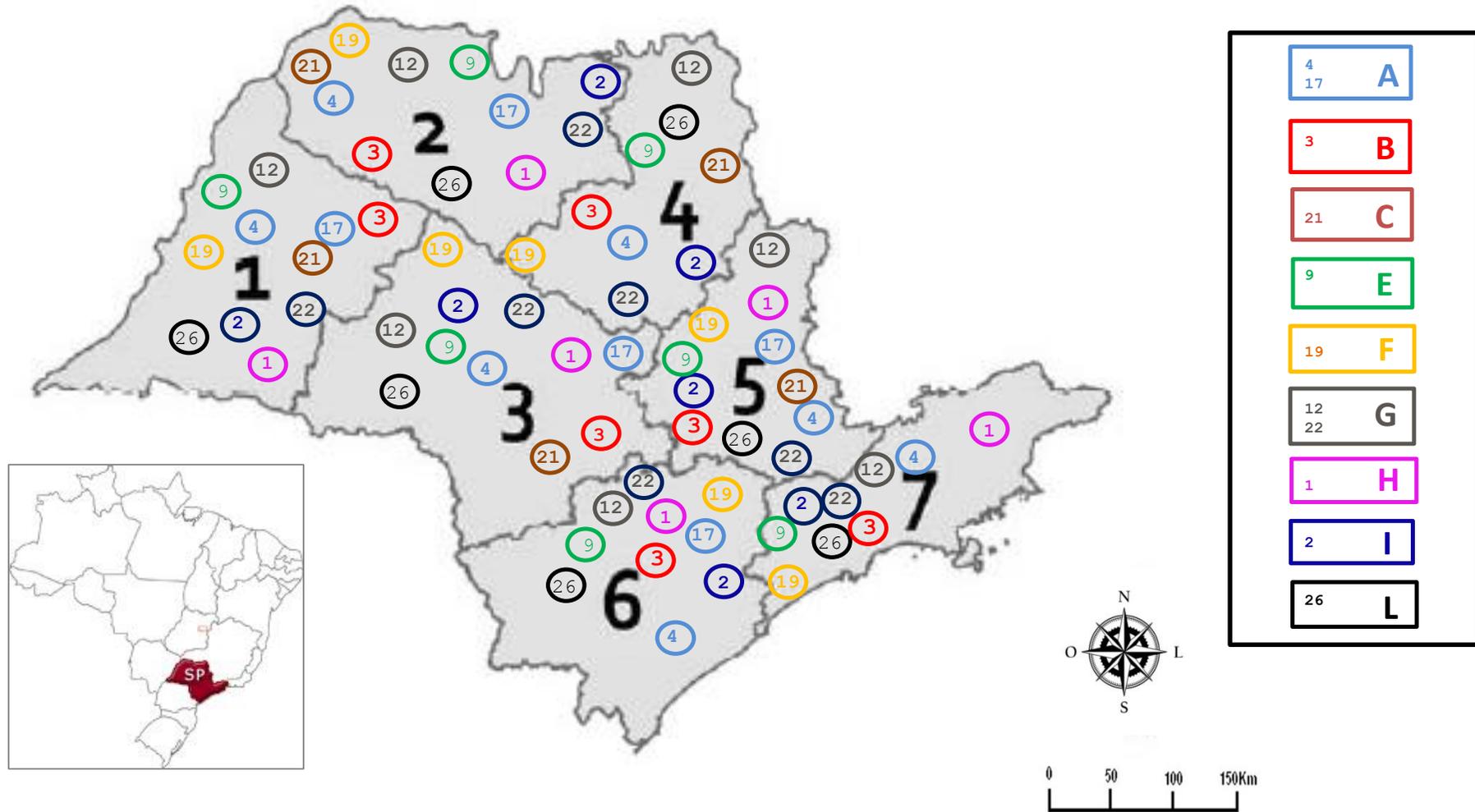


Figura 15- Distribuição de bovinos reagentes aos sorotipos de *Bluetongue virus* (BTV), identificados por virusneutralização em sete macrorregiões (circuitos de 1 a 7) do Estado de São Paulo. Os sorotipos estão indicados em cores diferentes, de acordo com os respectivos sorogrupos (A, B, C, E, F, G, H, I, L).

6.1.6 Estudo climático

O clima dos municípios paulistas, de acordo com a classificação de Koppen, engloba sete tipos climáticos distintos, sendo que grande parte corresponde ao clima úmido. O tipo climático Aw, caracterizado por altas temperaturas, clima tropical chuvoso com inverno seco e mais frio, com temperaturas médias superiores a 18°C, está presente nos circuitos 1, 2, 4 e 5, e é predominante no Estado, atingindo toda a sua porção noroeste/central. O tipo Cwa, está presente em regiões dos circuitos 4, 6 e 7, com chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C, sendo característico de clima tropical de altitude. O tipo Cfa (presente nos circuitos 5 e 6), que abrange a região sul do Estado, possui faixas de clima tropical, com verão quente, sem estação seca de inverno. Já o tipo Af (observado nos circuitos 6 e 7) concentra-se na faixa litorânea, caracterizada pelo clima tropical chuvoso, sem estação seca com a precipitação média do mês mais seco superior a 60 mm. Nas regiões mais altas como a da Serra do Mar e Mantiqueira, apresenta-se o tipo climático Cfb (que abrange o circuito 7), com verão ameno e onde o mês mais quente tem temperaturas médias inferiores a 22°C com chuva o ano todo. O circuito 3 apresenta os tipos climáticos Am e Cwa, caracterizados por clima tropical chuvoso, com inverno seco onde o mês menos chuvoso tem precipitação inferior a 60mm.

O estudo climático do Estado de São Paulo revelou que em 2011, as maiores concentrações de chuvas localizaram-se nas regiões litorâneas, mais especificamente Ubatuba (litoral Norte – circuito 7). Em contraste, a região de Votuporanga (noroeste paulista – circuito 2) apresentou os menores índices de chuva com precipitação anual de 1200 mm (Figura 16).

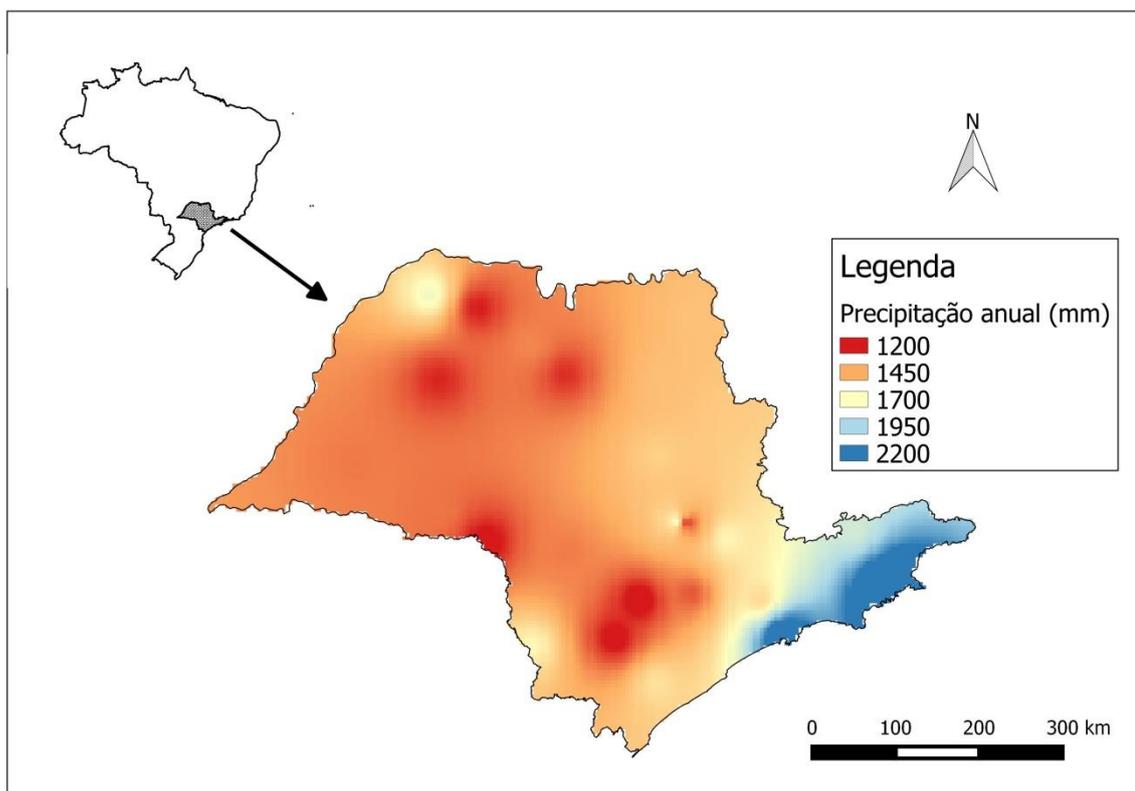


Figura 16- Mapa das precipitações (mm) médias do Estado de São Paulo obtido a partir do registro de 26 estações meteorológicas no ano de 2011.

A análise de dados de temperatura apontou a região noroeste do Estado com as maiores temperaturas, enquanto a região de Campos de Jordão (circuito 7) apresentou temperatura média de 19°C, considerada a mais baixa em comparação ao restante do Estado, provavelmente devido à sua localização na Serra da Mantiqueira a 1.600m de altitude. Na região do sul/sudoeste do Estado (municípios de Itararé, Itapetininga e Capão Bonito – circuito 6) também foram observadas as temperaturas mais baixas no ano de 2011 (Figura 17).

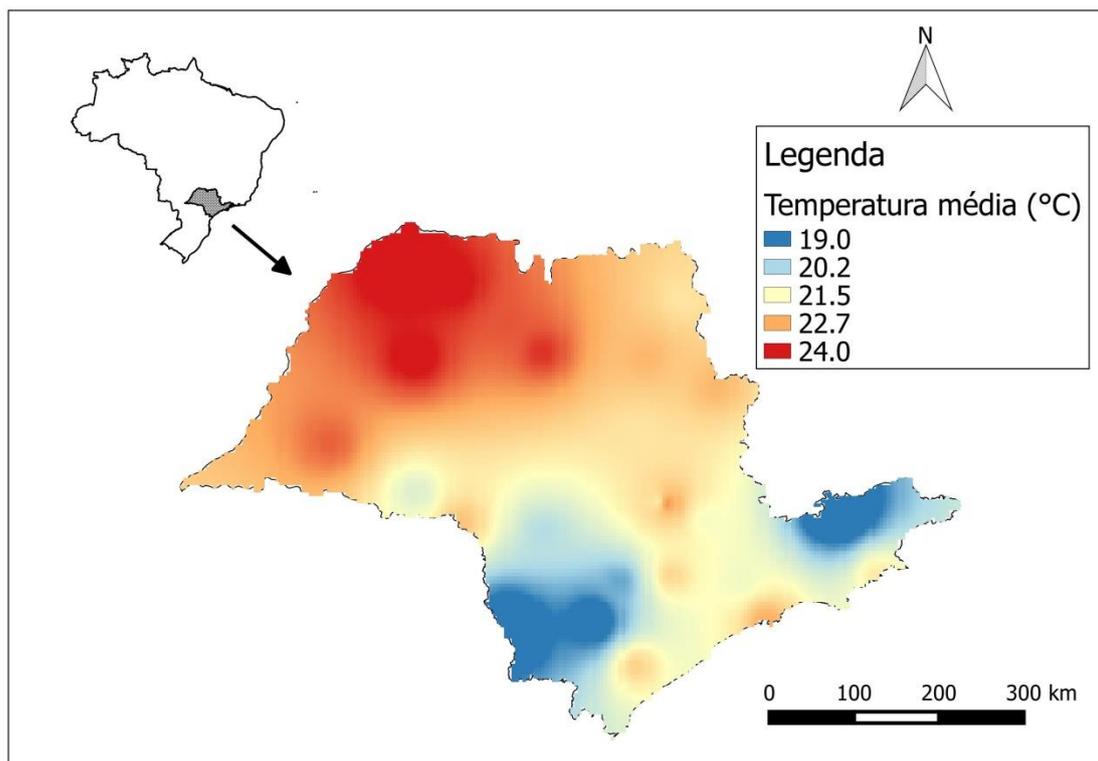


Figura 17- Mapa das temperaturas (°C) médias do Estado de São Paulo obtido a partir do registro de 26 estações meteorológicas no ano de 2011.

Os circuitos 1, 2 e 4 apresentaram registro das maiores temperaturas no ano de 2011, atingindo médias de 24°C. Apesar de esta ser uma região com menores índices de precipitação, as altas temperaturas aliadas à presença de precipitação (mesmo que em menor volume) pode ter favorecido o desenvolvimento dos vetores nesta região, visto que neste estudo foram detectados animais reagentes a diversos sorotipos (BTV-1, -2, -3, -4, -9, -12, -17, -19, -21, -22 e -26).

Os climogramas dos sete municípios representantes de cada circuito, referentes ao período de 2006 a 2016, revelaram a média mensal de distribuição de chuvas e temperaturas. A partir do desenho da curva de temperatura e das colunas de precipitação, foi possível observar que os municípios que ocupam a região noroeste do Estado (circuitos 1 e 2) apresentaram as maiores temperaturas médias, com máximas de até 33°C. Com a análise dos climogramas, foi possível observar que o ano de 2011 seguiu as tendências de temperaturas e precipitações registradas entre 2006 e 2016 (APÊNDICE C).

7 DISCUSSÃO

O estudo retrospectivo da prevalência de BTV contemplou 93,5% (603/645) dos municípios do Estado de São Paulo, de modo que quase a totalidade da extensão territorial do Estado foi explorada com o intuito de elucidar o incipiente conhecimento da situação epidemiológica do rebanho paulista frente ao BTV. Desde o início dos anos 1980, com o primeiro relato da presença do BTV no Brasil, muitos estudos de soroprevalência do vírus têm sido realizados no Estado de São Paulo. Cunha (1990), Arita et al. (1992), Nogueira et al. (2008), Venditti (2009), Bernardes (2011) e Lima (2013) identificaram elevada prevalência de bovinos e ovinos reagentes ao BTV, comprovando que o vírus ocorre de forma endêmica, e está amplamente distribuído por todo o Estado de São Paulo.

No presente trabalho, a avaliação de bovinos reagentes ao BTV (por sorogrupo) revelou que o sorogrupo L (ao qual pertence o sorotipo 26) foi o mais prevalente no Estado com 57,00% (IC= 95% [51,2-64,8]). Vale ressaltar que não há estudos anteriores que indiquem a presença do sorotipo 26 no Brasil. O sorogrupo A (ao qual pertencem os sorotipos 4, 10, 11, 17, 20 e 24) apresentou prevalência de 48,80% (IC= 95% [42,5-54,1]). Neste sorogrupo está presente o sorotipo 4, alvo de pesquisas sorológicas e moleculares anteriores, sendo confirmado como sorotipo endêmico no Estado (BERNARDES, 2011), seguido do sorogrupo C (ao qual pertencem os sorotipos 6, 14 e 21) com 30,66% (IC= 95% [23,8-37,7]) e sorogrupo I (ao qual pertence o sorotipo 2) com 31,03% (IC= 95% [26,8-38,6]) (Tabela 8). Devido à possibilidade de neutralização cruzada de anticorpos entre os sorotipos de BTV pertencentes ao mesmo sorogrupo, foi realizada a análise por sorogrupo de BTV, com o intuito de agrupar as prevalências de sorotipos semelhantes, que podem ser responsáveis por possíveis reações cruzadas. Estas reações, conhecidas por interações de anticorpos com antígenos heterólogos, ou vice-versa, podem ocorrer em função da similaridade entre dois diferentes determinantes antigênicos (epítomos), ou ainda pelo fato de dois antígenos diferentes apresentarem o mesmo determinante antigênico (HALLIWELL; GORMAM, 1992). O BTV, por se tratar de um vírus de RNA, com importante variabilidade genética, as reações cruzadas normalmente ocorrem em testes sorológicos devido à semelhança de epítomos pertencentes a antígenos distintos, que fazem parte do mesmo sorogrupo ou sorogrupos muito próximos. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo a realizar uma análise de BTV por sorogrupo no Estado de São Paulo.

Na análise de prevalência de sorotipos de BTV para as macrorregiões (7 circuitos) do Estado, os circuitos 1, 2, e 3 apresentaram as maiores prevalências quando comparados aos

outros circuitos. O circuito 1 está localizado na sua porção oeste e tem como principais representantes os municípios de Presidente Prudente e Araçatuba, que colaboram com a intensa atividade pecuária da região, sendo reconhecido como principal centro produtor de gado de corte do Estado (IBGE, 2016). Neste circuito, o sistema de criação extensivo é predominante, com baixa utilização de inseminação artificial e raças especializadas. É uma região em que as propriedades são consideradas como grandes e possuem uma intensa comercialização de bovinos associada também à presença de frigoríficos. Pode-se dizer que, nesta região, há condições propícias para a manutenção do ciclo do BTV, pois os bovinos são fontes de infecção para o vetor, apresentando longo período de viremia, sendo que os anticorpos específicos de BTV são detectados em cerca de duas semanas depois da infecção natural, persistindo entre quatro e seis anos (ESCHBAUMER et al., 2010; MAYO et al., 2010). Nogueira et al. (2009), em um inquérito soropidemiológico em ovinos no município de Araçatuba, identificaram por ELISA e IDGA prevalências superiores a 60%, confirmando que o BTV está disseminado nestas regiões, porém, de forma não aparente.

O circuito 2 tem como pertencente os municípios de Barretos e Votuporanga, faz divisa com o Estado de Minas Gerais, é caracterizado pelo predomínio de explorações mistas e de leite, com raças especializadas e predomínio de criação extensiva. Este circuito foi alvo de pesquisa sorológica, em que foram detectados animais reagentes ao BTV quando testados por ELISA e os mesmos animais foram não reagentes quando testados frente ao BTV-4 por VN, estes resultados sugerem a presença de outros sorotipos neste circuito (NOGUEIRA et al., 2016). O circuito 3, do qual fazem parte os municípios de Bauru e Botucatu, faz divisa com o Estado do Paraná, possui propriedades consideradas de tamanho médio, com o predomínio do tipo de exploração mista e de leite, com utilização de raças especializadas, criações extensivas e baixa utilização de inseminação artificial. Os 11 sorotipos de BTV identificados neste estudo estão presentes neste circuito.

Prevalência por sorotipo

Embora não tenham sido identificados casos clínicos da doença no rebanho bovino paulista, no presente trabalho, a presença de Ac específicos de diferentes sorotipos de BTV foram identificados, sugerindo que os animais foram expostos previamente, em maior ou menor grau, a pelo menos 11 sorotipos (BTV-1, -2, -3, -4, -9, -12, -17, -19, -21, -22 e -26). Em virtude de se tratar de um estudo retrospectivo, no qual os soros foram coletados em 2011,

com o objetivo de se estudar a prevalência de brucelose no Estado de São Paulo (DIAS et al., 2009), os animais possuíam idade igual ou superior a 24 meses, para evitar a detecção de anticorpos vacinais contra brucelose. Como se trata de um estudo de BTV, a análise de soro sanguíneo de animais adultos aumentou as possibilidades de detecção de Ac neutralizantes específicos contra o vírus. O BTV infecta bovinos, associando-se às hemácias e causando viremia prolongada, que pode durar meses (CLAVIJO et al., 2002). Os títulos de Ac detectados neste trabalho, provavelmente, referem-se a soroconversões de infecções por BTV, que na maioria das vezes ocorrem na idade de 6 a 12 meses, devido ao período de suscetibilidade dos bovinos, associado à ausência de anticorpos colostrais e exposição ao vírus. Alguns estudos sugerem que a soroprevalência da LA aumenta com a idade, sendo, muito provavelmente, um reflexo do maior tempo de exposição ao vetor e, conseqüentemente, ao vírus. O fator idade, em função do maior tempo de permanência dos animais no campo, pode também estar diretamente relacionado ao maior risco de infecção pelo BTV (WARD; CARPENTER; OSBURN, 1994; GONZÁLEZ; PÉREZ; SINGER, 2000).

A prevalência de bovinos reagentes ao BTV-1 no Estado de São Paulo foi de 22,15% (354/1598), confirmando que o BTV-1 está presente em todas as macrorregiões (7 circuitos) produtoras de bovinos do Estado de São Paulo. Este sorotipo também foi identificado em estudos moleculares nas mesmas regiões (dados não publicados). Além disso, nenhuma das 96 amostras reagentes ao sorotipo 1 apresentaram soropositividade para qualquer sorotipo pertencente aos sorogrupos próximos (BTV- 2, -8, -18, -23) (Figura 2), o que pode descartar a possibilidade de reações cruzadas para esta análise. Este é o primeiro relato do sorotipo 1 no Estado. O BTV-1 está distribuído pelos continentes africano, europeu e americano, de modo que apresenta particularidades e características de virulência e patogenicidade variáveis dependendo da região e do hospedeiro (EUROPEAN COMMISSION, 2016).

As prevalências de bovinos reagentes aos sorotipos BTV-3, -19 e -22, no Estado de São Paulo, foram, respectivamente, de 18,96% (303/1598), 10,20% (163/1598), 12,14% (194/1598). Esses sorotipos já haviam sido relatados em uma reserva ecológica no Estado do Paraná, infectando veados (*Mazama nana*) com sinais clínicos seguidos de morte (OIE, 2016). Essas informações reforçam a importância da realização de levantamentos soropidemiológicos e vigilância sanitária em áreas de floresta, onde há circulação de animais silvestres, principalmente cervídeos suscetíveis ao BTV, que podem ser infectados por estarem muito próximos a áreas de criação de bovinos (que são potenciais reservatórios do vírus) ou criações mistas de bovinos, ovinos, caprinos e búfalos. O Estado de São Paulo se

enquadra nesta situação, pois em algumas regiões é possível presenciar áreas de criação animal próximas a áreas de floresta como Unidades de Conservação (UC) e Áreas de Preservação Permanente (APP) (FUNDAÇÃO FLORESTA, 2017).

A prevalência de bovinos reagentes ao BTV-12 no Estado de São Paulo foi de 7,50% (120/1598). Este sorotipo já havia sido identificado em ovelhas no Estado do Rio Grande do Sul (ANTONIASSI et al., 2010), e mais recentemente, identificado por meio de estudos moleculares em amostras de sangue ovino e bovino provenientes de municípios paulistas dos circuitos 1, 2, 3, 4 e 6 (dados não publicados). Estes dados reforçam os resultados do presente trabalho, em que foram identificados Ac neutralizantes específicos para o sorotipo 12 nos mesmos circuitos.

O BTV-17 apresentou prevalência de 23,90% (382/1598) presente nos sete circuitos produtores, sendo este sorotipo identificado pela primeira vez no Estado de São Paulo. Matos et al. (2016) publicaram pela primeira vez no Brasil a sequência completa do BTV- 17, isolado de ovelhas no Estado do Rio Grande do Sul, cujas sequências indicam rearranjos desta estirpe com outros sorotipos de BTV das Américas.

Além dos sorotipos que já ocorriam em território nacional, os resultados do presente trabalho apontam para a primeira ocorrência dos seguintes sorotipos no Brasil: BTV-2 com prevalência de 31,03% (496/1598), BTV-9 com prevalência de 6,82 % (109/1598), BTV-21 com prevalência de 30,66% (490/1598) e BTV-26 com prevalência de 57,00% (911/1598). Vale mencionar que a maior parte do Estado de São Paulo localiza-se em uma região de clima tropical, com temperaturas médias e umidade elevada durante todo o ano, o que propicia a multiplicação e manutenção constante das populações de vetores no ambiente. A América do Sul, a Oceania e o Continente Africano (onde houve o primeiro relato da doença), estão inseridos na região denominada zona endêmica, em que os surtos ocorrem com frequência, normalmente de forma subclínica, e com a presença de diferentes sorotipos. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho com a identificação de 11 sorotipos de BTV no Estado de São Paulo estão de acordo com a literatura mundial (MAAN et al., 2010; VERDEZOTO et al., 2017).

A Austrália, por exemplo, considerada um dos maiores produtores mundiais de ovinos, possui um consolidado programa de vigilância e monitoramento para BTV, associado aos efetivos programas de vacinação, captura e identificação de vetores competentes na transmissão do vírus. Mesmo com toda a vigilância sanitária implementada no país, estão

presentes no território australiano os sorotipos de BTV-1, -2, -3, -7, -9, -15, -16, -20, -21 e -23 (MELVILLE, 2004; MELVILLE et al., 2015).

A Europa está localizada entre a zona epidêmica e zona incursiva relativas à presença de BTV, isso porque a temperatura não é favorável ao desenvolvimento do vetor o ano todo. Em países como Itália, França, Portugal e Espanha, por exemplo, surtos ocorrem predominantemente no período de verão, além da possibilidade do carreamento do vetor de outras regiões por meio do vento ou de tempestades de areia. Os sorotipos de BTV mais recorrentes em surtos nestes países europeus são BTV-1, -2, -4, -8 e -16 (EUROPEAN COMMISSION, 2016). É importante salientar a complexidade e dificuldade de controle do BTV, pois diversos países que possuem avançado conhecimento na epidemiologia do vírus e das espécies vetoras competentes em seu território, se deparam com dificuldades no controle da doença, sendo que novos casos continuam a ocorrer à medida que também novos sorotipos são identificados.

A China está localizada aproximadamente a 50°N, também considerada região de propagação do vírus (MELLOR, 1996), sendo classificada como uma área de zona incursiva, em que a doença, normalmente ocorre em intervalos mais longos devido às baixas temperaturas. Mesmo não sendo uma região muito favorável ao desenvolvimento do vetor, o país já confirmou a circulação dos sorotipos de BTV-1, -2, -3, -4, -5, -7, -12, -15, -16 e -24, além de um novo sorotipo identificado recentemente, porém ainda não caracterizado (SUN et al., 2016).

O BTV tem sido notificado em diversos países do Oriente Médio, como Egito, Jordânia, Síria, Turquia, Chipre e Iraque. Estas infecções são caracterizadas por afetar diversas espécies de ruminantes e com a presença de múltiplos sorotipos do vírus. Em 2010, no Kuwait, foi relatada a caracterização de um novo sorotipo, o BTV-26 em ovelhas (MAAN et al., 2011). Posteriormente, em 2013, foi relatada a primeira evidência de circulação do BTV-26 fora do Kuwait, em gazelas e gnus no Parque Nacional Etosha na Namíbia (CAPOBIANCO et al., 2013). O sorotipo BTV-26, de acordo com o alinhamento de nucleotídeos do segmento 2, é antigenicamente semelhante aos sorotipos BTV-25 e -27 (não testados neste trabalho). Apesar disso, no presente trabalho foram identificados títulos altos de Ac neutralizantes específicos para o BTV-26 nos 7 circuitos, comprovando a circulação do sorotipo em diversas regiões do Estado. A escassez de pesquisas sorológicas brasileiras que contemplem toda a diversidade

genética do BTV e também a sua variabilidade antigênica dificulta e limita o potencial confronto com resultados anteriores.

O BTV é uma doença de notificação obrigatória responsável por causar barreiras sanitárias para o comércio de sêmen e circulação de animais vivos (OIE, 2012) Este estudo, representa um avanço no conhecimento da doença, tanto com a identificação dos sorotipos circulantes, como sua distribuição no território brasileiro, de modo que este possa dar suporte aos programas de prevenção e controle da doença, garantindo a saúde do rebanho, produtos de qualidade e conseqüentemente, a manutenção do sucesso do agronegócio brasileiro.

Virusneutralização para o BTV-4 e análises in silico

A prevalência de 24,90%, obtida para o BTV-4 nas análises de VN realizadas com a estirpe italiana, apresentou discrepância quando comparada aos resultados obtidos anteriormente por Nogueira et al. (2016) com a estirpe brasileira, em que a prevalência do BTV-4 foi de 86%. A repetição das análises de VN, empregando os diferentes protocolos com pequenas alterações e utilizando isolados de BTV-4 (brasileiro e italiano), sugerem que essa diferença se deveu à estirpe do vírus, única variável que impactou no resultado. Em um estudo semelhante de soroprevalência de BTV, nos mesmos circuitos produtores do Estado de São Paulo, Bernardes (2011) identificou, por meio das técnicas de VN e IDGA, 43,8% de animais reagentes para o BTV-4, sendo que a prevalência nos circuitos variou entre 56,8% e 79,6%.

As diferenças observadas na VN também podem ter ocorrido devido à variabilidade genética do vírus entre as estirpes de BTV-4 brasileira e italiana, explicadas pelas diferentes origens geográficas, e/ou por constatação direta nas análises do genoma, em comparações de aminoácidos da proteína VP-2 dos dois isolados de BTV-4 [italiano (código do *GenBank* - KM233615.1) e brasileiro (sequência não publicada)]. Neste sentido, observaram-se diferenças entre as sequências de aminoácidos, que, de alguma forma, podem representar potenciais alterações na estrutura da proteína VP-2 (capsídeo externo), com conseqüente alteração no reconhecimento Ag-Ac e provável influência nos resultados dos testes sorológicos.

As proteínas estruturais presentes no núcleo de partícula do BTV (VP-1, VP-3, VP-4, VP-6 e VP-7), bem como as proteínas não estruturais (NS-1 a NS-5) são mais conservadas do que as proteínas VP-2 e VP-5 (MERTENS et al., 2005; MAAN et al., 2007; ATTOUI et al.,

2012). No entanto, essas proteínas apresentam variações na sequência de aminoácidos, que se correlacionam diretamente com as suas origens geográficas, possibilitando o agrupamento de isolados de BTV em topotipos distintos. Por exemplo, verificou-se que as sequências de aminoácidos da proteína VP-3 (codificada pelo segmento 3) formam três distintos topotipos conhecidos: ‘oriental’, ‘oriental-distante’ e ‘ocidental’, bem como sub-grupos (por exemplo os vírus americanos e africanos, respectivamente, dentro do grande topotipo ‘ocidental’). Há também evidências de um topotipo ainda mais distantemente relacionado ('extremo oriente') contendo isolados de BTV provenientes da China e da Austrália, além de grupos distintos representados por isolados dos sorotipos BTV-25 e BTV-26 (MAAN et al., 2011; 2015; NOMIKOU et al., 2009; 2015).

Em estudos anteriores, empregando métodos sorológicos, detectaram-se sorotipos de BTV co-circulantes (HAGE et al., 2013). A técnica da RT-qPCR tem sido utilizada na identificação de vários isolados do BTV, incluindo co-infecções, que podem apresentar reações cruzadas ou deixar dúvidas no diagnóstico sorológico (MAAN et al., 2016). Recentemente, novos sorotipos de BTV (BTV-25, -26 e -27) foram identificados por sequenciamento, incluindo ensaios de RT-PCR, e posteriormente confirmados como novos sorotipos por meio de VN (sorotipagem) (MAAN et al., 2011; ZIENTARA; SANCHEZ-VIZCAÍNO, 2013; ZIENTARA et al., 2014). Deste modo, é importante a associação de diferentes técnicas diagnósticas (sorológicas e moleculares) que se complementem com o objetivo de se obter resultados mais robustos e confiáveis. Porém, é importante ressaltar que os resultados (sorológicos e/ou moleculares) devem ser interpretados com base nos conhecimentos da epidemiologia, clínica e patológica, sem deixar de lado a realização do diagnóstico diferencial para doenças confundíveis.

Vale lembrar que a partícula do BTV é constituída de duas proteínas externas (VP-2 e VP-5). A VP-2, codificada pela ORF do segmento 2, é a proteína que contém a maioria dos antígenos neutralizadores virais e apresenta elevada variabilidade na sequência de aminoácidos. Essa variabilidade resulta em populações de vírus similares, mas não idênticos, que, atualmente, são classificados de acordo com o relacionamento sorológico em 29 sorotipos. A variabilidade do BTV vai além, sendo que os sorotipos podem ser subdivididos em diferentes estirpes (MAAN et al., 2011). Além disso, os sorotipos, por sua vez, de acordo com as sequências de aminoácidos da VP-2, são classificados em sorogrupos (MAAN et al., 2011; ZIENTARA et al., 2014).

Testes sorológicos, como a VN podem ter a sua sensibilidade reduzida quando utilizados para a detecção de anticorpos contra vírus antigenicamente variáveis, como nos vírus de genoma de RNA. Vale ressaltar que os vírus de RNA, das entidades biológicas conhecidas, são os que mais sofrem mutações, uma vez que as RNA polimerases virais dependentes de RNA (RdRp) não apresentam motivos de correção de erros de incorporação de nucleotídeos durante a replicação viral. As mutações, recombinações e rearranjos são fontes de variabilidade genética, que são importantes, principalmente nos vírus de RNA com genoma multipartido, como os reovírus, e especificamente o BTV. A diversidade existente entre os vírus de RNA é benéfica para a sobrevivência viral, pois favorece a evasão da resposta imune do hospedeiro (RIDPATH, 2003). Essas características exigem que os laboratórios sejam vigilantes e capacitados para diagnosticar, caracterizar e diferenciar vírus com tais estratégias de evolução biológicas, podendo evitar resultados falso-negativos e/ou equivocados decorrentes de reações cruzadas entre sorotipos. Neste caso, a utilização de um vírus padrão, diferente dos vírus que ocorrem no campo, pode levar a resultados falso-negativos (FLORES et al., 2005). Portanto, a discordância de resultados sorológicos observados no presente trabalho quando testado para o BTV-4, sinaliza a importância da execução dos testes com estirpes representativas de isolados brasileiros do BTV, pois tais isolados podem apresentar grande variabilidade antigênica comparada a estirpes europeias.

Fatores de risco

Na análise de fatores de risco para LA com base em práticas zootécnicas e sanitárias das propriedades, a variável aquisição de bovino foi considerada fator de risco (OR=2,183) para a ocorrência de BTV (Tabela 23). O *odds ratio* (OR) ou razão de chances traduz a probabilidade de a infecção ocorrer ou não na presença da variável em estudo sobre a mesma probabilidade na ausência da variável (THRUSFIELD, 2007). Este resultado indica que, em propriedades em que bovinos são adquiridos, há uma chance de 2,183 vezes maior de terem seus rebanhos infectados pelo BTV, sinalizando para a importância do controle sanitário dos animais quando são introduzidos nas propriedades e também na rastreabilidade destes animais adquiridos, que podem estar em viremia, uma vez que podem ser originários de áreas livres e com esta prática serem introduzidos em áreas endêmicas ao vírus ou de determinado sorotipo. Na Europa, existe um rigoroso programa de movimentação animal entre os países, criado pela COMISSÃO DE REGULAÇÃO EUROPEIA visando ao monitoramento, controle e restrição de trânsito de animais, para evitar a circulação dos diferentes sorotipos de BTV, ou a

introdução do vírus em áreas livres (EUROPEAN COMMISSION, 2017). Além da proibição da importação de animais provenientes de países com BTV, é frequente o monitoramento de fazendas por meio de exames clínicos, sorológicos e moleculares, certificando que os animais são livres de BTV (SPERLOVA; ZENDULKOVA, 2011).

A variável inseminação artificial, apesar de não ter apresentado valor significativo de p (0,91), por esta razão não entrou para o modelo final de análise de risco, foi observado que 88,7% dos rebanhos reagentes ao BTV usam inseminação artificial e touro e 11,4% usam somente inseminação artificial. Este é um dado relevante, pois o BTV pode ser transmitido por meio do sêmen, caso o touro esteja no período de pico de viremia (WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006). Os sorotipos BTV-4, BTV-8, BTV-10 e BTV-16 foram relatados no Estado de Minas Gerais, que é o segundo Estado em produção de bovinos no país (o Estado do Mato Grosso, atualmente, é o maior produtor nacional). A detecção foi realizada em sêmen bovino de animais provenientes dos municípios Carlos Chagas, Pedro Leopoldo, Coronel Pacheco e Ituiutaba. Além disso, no mesmo estudo foi relatado que essas amostras, que continham diferentes sorotipos de BTV, estavam também infectadas com BVDV-1, comprovando a co-infecção entre diferentes patógenos em uma mesma partida de sêmen bovino (GASPARINI, 2014). A presença do vírus no sêmen bovino é um dado preocupante para centrais de inseminação, colocando em risco a comercialização de material genético. É importante ressaltar que os sorotipos circulantes em regiões vizinhas (como Minas Gerais) podem servir como fonte de inóculo para o rebanho bovino (e também rebanhos ovino e caprino) paulista e vice-versa, seja por meio do trânsito animal e/ou por meio do deslocamento natural dos vetores entre as regiões. As fronteiras geopolíticas não impedem a circulação dos vetores, o que, em parte, pode explicar os surtos recorrentes de LA, como o ocorrido, em 2014, em ovinos no Estado do Rio de Janeiro, com a identificação do sorotipo BTV-4 (BALARO et al., 2014).

A presença de ovinos e animais silvestres nas propriedades com bovinos reagentes ao BTV não apresentaram valores de p (0,40) significativos para a análise final de fator de risco. Porém, a presença de diferentes espécies na mesma propriedade pode favorecer a presença da doença, pois o bovino, sendo reservatório assintomático do vírus durante um longo período, representa uma ameaça às outras espécies susceptíveis e mais sensíveis que apresentam sinais clínicos graves e morte quando infectados com o BTV (COSTA et al., 2006; LOBATO; GUEDES; MATOS, 2015).

Quanto às áreas alagadas, não se observou valor significativo de p (0,85), e assim essa variável não entrou para o modelo final de análise de risco. Foram observadas áreas alagadas em 13,1% das propriedades com rebanhos reagentes ao BTV, sendo importante lembrar que este fator de risco está diretamente relacionado aos vetores, uma vez que os *Culicoides* são abundantes em regiões quentes, úmidas e com disponibilidade de água para o seu desenvolvimento (MELLOR, 2000).

Uma importante variável como fator de risco que não foi abordada neste estudo é a presença de *Culicoides* nas propriedades amostradas, pois a presença do inseto vetor competente, associada à presença do hospedeiro, são determinantes para a ocorrência da doença. Tendo em vista a importância da LA no Estado de São Paulo, sugere-se à Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado a inclusão deste item (presença de culicoides) nos questionários de levantamento epidemiológico e vigilância de doenças.

Análise climática

O BTV está presente, principalmente, em regiões geográficas que abrangem as latitudes 40°N e 35°S, consideradas áreas favoráveis ao desenvolvimento do vetor (MELLOR, 2000; MELLOR; WITTMANN, 2002). O Estado de São Paulo localiza-se a 21° de latitude Sul, situado em uma região endêmica para a presença do vírus. Os fatores climáticos como altas temperaturas e precipitação, associadas à presença de ruminantes, favorecem o desenvolvimento dos vetores competentes do vírus. O ano de 2011 seguiu as tendências de temperatura e precipitação para os dez anos de estudo (2006-2016), de acordo com registros de estações meteorológicas do INMET (APÊNDICE D). Análises de temperatura e precipitação que ocorreram no Estado de São Paulo em 2011 revelaram temperaturas médias de 21,5 a 24°C, com máxima de até 35°C nas porções noroeste/central que abrange os circuitos (1, 2, 3, 4), sendo que nestes circuitos foram identificados bovinos reagentes a diferentes sorotipos do BTV. Além disso, os índices de precipitação nestes circuitos foram relativamente baixos, com médias de 1200 - 1700 mm. Provavelmente, a associação de temperaturas elevadas e a presença de água, mesmo que restritas ao período chuvoso (de outubro a março) foram suficientes para o desenvolvimento dos ovos das fêmeas hematófagas. Vale lembrar que em locais onde a temperatura não é limitante para os insetos vetores, os picos populacionais estão relacionados, principalmente, com a duração da estação chuvosa (MURRAY, 1975).

A região que abrange o circuito 7 apresentou os maiores índices de precipitação (1950-2200 mm) do Estado em 2011, e as menores temperaturas (19°C- 20°C). Essa combinação de maior umidade com temperaturas mais baixas provavelmente não favorece e/ou reduz a multiplicação do vetor competente. Este circuito apresentou as prevalências mais baixas de infecções por BTV neste estudo. O município de Ubatuba, por exemplo, está localizado no litoral norte do Estado, entre as Serras da Mantiqueira e do Mar, que formam uma barreira física e submete a região a uma das maiores taxas de precipitações do Estado, com chuvas constantes o ano todo (BARBOSA, 2006). Além disso, o município está dentro do Parque Estadual da Serra do Mar, com grandes áreas de matas preservadas, que, de certa forma, geram um equilíbrio natural entre predadores e inimigos naturais, que podem controlar as populações de culicoides. Vale lembrar que os municípios que abrangem o circuito 7 não possuem intensa atividade pecuária como, por exemplo, os municípios do oeste paulista. Portanto, a região não possui grande disponibilidade de ruminantes, tampouco condições climáticas para o desenvolvimento do vetor. As gerações anuais de culicoides são influenciadas pelos índices de precipitações e temperaturas, responsáveis por formar áreas de reprodução dos insetos vetores, podendo elevar as taxas de transmissão no período chuvoso e quente (MELLOR, 2000). A dinâmica populacional das espécies de culicoides depende de variáveis climáticas como temperatura, umidade, pluviosidade e ventos. Dentre estas, a temperatura ótima de desenvolvimento de cada espécie de *Culicoide* é fundamental para o seu ciclo de vida. Estudos estabelecem as temperaturas entre 27°C e 30°C como ideais para a transmissão do BTV (MELLOR; BAYLIS; MERTENS, 2009). As altas temperaturas reduzem a duração do ciclo gonotrófico e aumentam a taxa de picadas do vetor. Mullens; Holbrook (1991) demonstraram que fêmeas de *Culicoides variipennis sonorensis* se alimentam de sangue a cada três dias quando submetidos a temperatura de 30°C, e somente a cada quatorze dias quando a temperatura cai para 13°C, ou seja, quanto mais altas as temperaturas, maior será a frequência de alimentação dos insetos vetores e, conseqüentemente, haverá redução do período de incubação extrínseco para formação de ovos. Estudos realizados no Brasil e na América do Sul apontam que o *C. insignis* é a espécie predominante, porém pouco se sabe sobre o comportamento dessa espécie e tampouco sobre a sua distribuição (MO et al., 1994; RONDEROS et al., 2003). Um estudo realizado no Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil, identificou sete espécies de *Culicoides*, dentre elas o *C. insignis* em áreas rurais que apresentavam condições ambientais favoráveis, tais como áreas lacustres, alagadiças e brejos. Vale lembrar que esta espécie é conhecida pela atração por gado bovino (TRINDADE et al., 2010; COSTA et al., 2013). A distribuição geográfica do BTV tem sido

influenciada pelas mudanças climáticas, ocorridas ao longo dos anos devido ao aumento da temperatura global, determinando o aumento das populações de insetos vetores e, conseqüentemente, o aumento dos casos de infecções por BTV em todo o mundo. As alterações climáticas têm efeitos diretos e indiretos na transmissão do BTV e outras arboviroses, tais como: (i) frequência de deposição de ovos; (ii) redução no tempo de maturação de ovos; (iii) adaptação ou migração dos vetores; (iv) estresse térmico aos hospedeiros (AHUMADA et al., 2004; BETT et al., 2017). Recentemente, na China, em um estudo de soroprevalência de BTV em ovelhas e bisões asiáticos, “yaks” (*Bos grunniens*), os autores observaram que as estações do ano, principalmente verão e outono, foram considerados fatores de risco para infecções por BTV (MA et al., 2017). Ao contrário, no Brasil, em função de suas condições climáticas, a maior parte do seu território está localizada em zonas equatoriais, tropicais e subtropicais, e, portanto, não enfrenta invernos rigorosos. Com isso, os culicídeos encontram condições favoráveis ao seu desenvolvimento durante o ano todo.

Barreiras geográficas podem limitar o padrão de distribuição do BTV, pois as características geográficas de países como Chile e outros que estão muito próximos da Cordilheiras dos Andes e deserto do Atacama não foram detectados casos de BTV (LEGISA et al., 2014). Estas regiões apresentam temperaturas mais baixas e elevadas altitudes que podem não ser adequadas para ciclo de vida do *Culicoides* spp.

A emergência do BTV no Brasil destaca a importância da realização de estudos entomológicos futuros, com captura e identificação das espécies de Culicídeos, de modo que possam proporcionar avanços no conhecimento do comportamento e distribuição dos insetos vetores competentes. Além disso, também são necessários estudos climáticos e ambientais, fundamentais para identificar áreas de risco e poder realizar medidas de controle dos insetos vetores e da doença.

Portanto, a técnica de VN, considerada padrão pela OIE, devido a sua sensibilidade e especificidade na identificação de sorotipos de BTV, apresentou-se neste estudo populacional de bovinos como um diagnóstico eficiente na identificação de animais reagentes para o BTV, com resultados positivos em uma amostragem única (descartando a possibilidade de Ac induzidos por vacinas) indicando a circulação prévia e/ou atual do vírus no rebanho. Sendo assim, o presente trabalho indica (e reforça) a condição de portador de anticorpos do rebanho paulista. Se tratando de um estudo retrospectivo, com colheitas realizadas em 2011, a

prevalência observada resgata uma fotografia instantânea da condição sanitária do rebanho frente ao BTV, podendo assim identificar os sorotipos e compreender a dinâmica da doença na população no período estudado. Com a distribuição dos sorotipos de BTV no Estado, foi possível observar uma maior concentração de diferentes sorotipos de BTV na região do oeste paulista, possivelmente por esta região possuir maior quantidade de bovinos, uma grande aquisição de bovinos provenientes de outras regiões, e temperaturas propícias à reprodução dos insetos vetores competentes. O cruzamento de dados epidemiológicos, climáticos, ambientais, entomológicos e a identificação de áreas de risco ou de risco potencial, se mostram fundamentais na pesquisa epidemiológica do BTV com aspectos multidisciplinares. Estas ferramentas poderão futuramente produzir informações oportunas para o monitoramento da doença e aumento da capacidade preditiva das autoridades sanitárias frente às infecções causadas pelo vírus.

O presente trabalho proporcionou um avanço no conhecimento da epidemiologia de BTV no Estado de São Paulo com evidência sorológica de diversos sorotipos, confirmando a variabilidade genética e antigênica do vírus descrita mundialmente. A complexidade do BTV e a sua capacidade de adaptação a hospedeiros vertebrados e invertebrados, e os mecanismos de variabilidade tais como mutação, recombinação e rearranjos, resultam em novas gerações com propriedades distintas, como diferentes níveis de patogenicidade e virulência, interações diversas com o sistema imunológico de cada hospedeiro, entre outras. Estas são consideradas eficientes estratégias de evolução e sobrevivência do vírus, sendo que tais variabilidades dificultam os testes de diagnóstico e o controle da doença pela vacinação (FULTON et al., 2003). Neste sentido, a caracterização e o monitoramento do vírus tornam-se um trabalho constante frente a cada novo isolado identificado no território nacional e internacional, sendo que tais medidas futuramente refletirão no manejo sanitário do rebanho e em programas de vacinação.

8 CONCLUSÕES

- Identificou-se, por meio de virusneutralização, ampla disseminação de bovinos reagentes com anticorpos neutralizantes específicos para 11 sorotipos de BTV: BTV-1 (22,15%), BTV-2 (31,03%), BTV-3 (18,96%), BTV-4 (24,90%), BTV-9 (6,82%), BTV-12 (7,50%), BTV-17 (23,90%), BTV-19 (10,20%), BTV-21 (30,66%), BTV-22 (12,14%), BTV-26 (57,00%) no Estado de São Paulo;

- Foram identificados, pela primeira vez no Brasil, os sorotipos: BTV-1, BTV-2, BTV-9, BTV-21 e BTV-26, demonstrando a importância do estudo soroepidemiológico na vigilância de LA;

- O estudo de análise de risco para BTV indicou que a aquisição de bovídeos pode ser uma forma de introdução da doença nas propriedades, sendo necessário o desenvolvimento de medidas sanitárias em áreas endêmicas incluindo vacinas;

- Nas análises climáticas, o circuito 1 apresentou as maiores médias de temperaturas (22,7°C – 24,0°C) e as menores médias precipitações (1200 mm – 1450 mm) (para 2011, ano da colheita dos soros), o que sugere que a proliferação do vetor, neste circuito, concentrou-se no período chuvoso;

- As análises *in silico* das sequências do BTV-4 (estirpes brasileira e italiana) revelaram diferenças significativas nas sequências de aminoácidos, sinalizando a importância do isolamento viral e execução dos testes de diagnóstico sorológico com estirpes de isolados de BTV brasileiros;

- O BTV está distribuído por todas as macrorregiões (7 circuitos) do Estado, sendo que os circuitos 1, 2 e 3 (oeste paulista) apresentaram as maiores prevalências de animais reagentes ao BTV, de modo que são necessários mais estudos com aspectos mult disciplinares, envolvendo abordagens entomológicas, climáticas e epidemiológicas com vistas à implementação efetiva da vigilância epidemiológica e programas sanitários para o BTV.

9 REFERÊNCIAS

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne): Sanidade em bovinos. Disponível em http://www.abiec.com.br/3_sanidade.asp/. Acesso em: 10 jun. 2016.

ABREU, V. L. V. **Prevalência de Bovinos Reagentes à Prova de Imunodifusão para Língua Azul na Região Norte do Brasil**. 1982. 45 f. Dissertação (Escola de Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, Weybridge, v. 60, n. 2, p. 93-109, 1990.

AFSHAR A. Bluetongue: laboratory diagnosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 17, p. 221-242, 1994.

AGREN, E. C. C. et al. Possible means of introduction of bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) to Sweden in August 2008: comparison to results from two models for atmospheric transport of *Culicoides* vector. **Veterinary Record**, London, v. 167, p. 484–488, 2010.

AHUMADA, J. A.; LAPOINTE, D.; SAMUEL, M.D. Modeling the population dynamics of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae), along an elevational gradient in Hawaii. **Journal of Medical Entomology**, Lawrence, v. 41, p. 1157–1170, 2004.

ALCARDE A. C. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Alemanha, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007 p. 793-807.

ALVES, F. A. L. et al. Soroprevalência e fatores de risco para língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 484-489, 2009.

ANTONIASSI, N.A.B. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 1010-1016, 2010.

ARITA, G. M. et al. Comparison of indirect immunofluorescence with agar gel immunodiffusion for the diagnosis of bluetongue virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 503-508, 1992.

ATTOUI, H. et al. Yunnan orbivirus, a new orbivirus species isolated from *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in China. **The Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 3409-3417, 2005.

ATTOUI, H. et al. Peruvian horse sickness virus and Yunnan orbivirus, isolated from vertebrates and mosquitoes in Peru and Australia. **Virology**, Nova Iorque, v. 394, n. 2, p. 298-310, 2009.

ATTOUI, H. et al. *Reoviridae*. In: KING, A.; ADAMS, M.; CARSTENS, E.; LEFKWITZ, E. (Eds.). **Virus Taxonomy**, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK: Elsevier Academic Press, 2012.

AZEVEDO, D.M.M.R. A pecuária de corte no Brasil: a introdução do bovino zebu. Agrolink. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/colunistas/a-pecuaria-de-corte-no-brasil--a-introducao-do-bovino-zebu_385142.html>. Acesso em 20 fev. 2017. Publicado em 12/12/2007.

BALARO, M. F. A. et al. Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 26, p. 567-570, 2014.

BARRATT-BOYES, S.; MACLACHLAN, N. J. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 361-371, 1994.

BARBOSA, J. P. M. Utilização de método de interpolação para análise e espacialização de dados climáticos: O SIG como ferramenta. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia,- revista *on line*, v. 9, n. 17, p. 85-96, 2006.

BARROS, V. L. L. et al. Ocorrência de espécies de *Culicoides Latreille* (Diptera, Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 11, p. 2789-2790, 2007.

BATTEN, C. et al. Evidence for Transmission of Bluetongue Virus Serotype 26 through Direct Contact. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p.e0096049, 2014.

BAYLIS, M. et al. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 171-181, 2005.

BEEFPOINT: Sanidade em bovinos de corte: principais conceitos sobre a saúde do rebanho. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/sobre-o-site/novas-do-site/sanidade-em-bovinos-de-corte-principais-conceitos-sobre-a-saude-do-rebanho-69739/>. Acesso em: 15 jan 2016.

BELBIS, G. et al. Evidence of transplacental transmission of bluetongue virus serotype 8 in goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 394-404, 2013.

BELHOUCHE, M. et al. Detection of a fourth *orbivirus* non-structural protein. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 10 p. 256-297, 2011.

BERNARDES, N. T. C. G. **Soroprevalência da língua azul em bovinos do Estado de São Paulo. Brasil, 2001**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2011.

BETT, B. et al. Effects of climate change on the occurrence and distribution of livestock diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 137, p. 119-129, 2017.

BHANUPRAKASH V. et al. Bluetongue vaccines: the past, present and future. **Expert Reviews Vaccines**, Abingdon, v. 8, p. 191– 204, 2009.

BIRLEY, M.H. et al. Estimating the survival and biting rates of haematophagous insect with particular reference to *Culicoides obsoletus* group in Southern England. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 51 p. 135–148, 1982.

BORKENT, A.; WIRTH, W.W. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). **Bulletin American Museum of Nature History**, New York, p. 233-257, 1997.

BOWEN, R. A.; HOWARD, T. H. Transmission of Bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus-containing bovine semen. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 45, n. 7, p. 1386-1388, 1984.

BREARD, E. et al. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 77, p. 1-8, 2004.

BREWER, A. W.; MACLACHLAN, N. J. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. **Archives of Virology**, New York, v. 136, p. 287-298, 1994.

CALLEMAN, S.M.Q.; CUNHA, C.F.; ALCANTARA, N.B. A Agroindústria Exportadora de Carne Bovina no Brasil: Uma Análise da Estrutura de Mercado e da Conduta Estratégica das Firmas. In: **SEMEAD**, v. 12, 2009, São Paulo. In: ANAIS ELETRÔNICOS USP, 2009. Disponível em: <<http://www.ead.fea.usp.br/semead/12semead/resultado/trabalhosPDF/542.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

CALVETE, C. et al. Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. **Medical and Veterinary Entomology**, Amsterdam, v. 24, p. 169-175, 2010.

CAMPOS, R. R. **Tecnologia e concorrência na indústria brasileira de carnes na década de oitenta**. 1994. 100 f. Tese (Doutorado) Instituto de Economia, Universidade de Campinas, Campinas, 1994.

CAPOBIANCO, D. A. et al. Bluetongue in springboks and wildebeests in the Etosha National Park (Namibia): circulating strains and epidemiology. In: ANNUAL MEETING EPIZONE: NOTHING PERMANENT, EXCEPT CHANGE, 7., 2013, Brussels. **Anais**. Belgium. 2013, p. 114, 2013.

CARPENTER, S.; WILSON, A.; MELLOR, P.S. Culicoides and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, p. 172–178, 2009.

CASTRO, R.S. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implication in international embryo trade. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 24, p. 173-176, 1992.

CATI - COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/novacati>. Acesso em: 20 Abr. 2016.

CHAIGNAT, V. et al. Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep, **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 138, p. 11–19, 2009.

CHAND, K. et al. Bluetongue in India: A Review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Pakistan, v. 3, n. 11, p. 605-612, 2015.

CLAVIJO, A. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **The Veterinary Record**, London, v. 151, p. 301-302, 2002.

COSTA, J. R. R. **Produção e Padronização de Antígeno para Língua Azul e Prevalência nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul**. 2000. Dissertação - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

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**, Belo Horizonte, v.58, n. 2, p. 273-275, 2006.

COSTA, J. C. et al. Espécies de Culicoides (Diptera; Ceratopogonidae) e hospedeiros potenciais em área de ecoturismo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 4, n. 3, p. 11-18, 2013.

CUNHA, R. G. Anticorpos neutralizantes em soros de ruminantes domésticos do Brasil frente aos diferentes sorotipos do vírus da língua azul. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.12, p. 3-7, 1990.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A. C. Anticorpos Precipitantes para o Vírus da Língua Azul em Soros de Bovinos do Estado do Rio de Janeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.48, p.99103, 1982.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; PASSOS, W. S. Anticorpos para o vírus da língua azul em soros de bovinos do Estado de São Paulo e da região Sul do País. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 121-124, 1987.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A. C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 3, supl. 2, p. 53-56, 1988.

DARPEL, K. E. et al. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. **The Veterinary Record**, London, v. 161, n. 8, p. 253–261, 2007.

DARPEL, K. E. et al. Transplacental Transmission of Bluetongue Virus 8 in Cattle, UK. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.15, n.12, p. 2025-2028, 2009.

DE CLERCQ, K. et. al Emergence of bluetongue serotypes in Europe, Part 2: The occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 56, p. 355–361, 2009.

DERCKSEN, D. et al. First outbreak of bluetongue in goats in The Netherlands (in Dutch). **Tijdschrift Diergeneeskunde**, Amsterdam, v. 132, p. 786–790, 2007.

DESMECHT, D. et al. Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. **Veterinary Record**, London, v. 163, p. 50-52, 2008.

DIAS, R. A. **Caracterização espacial da brucelose bovina no Estado de São Paulo, 2004**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DIAS, R.A. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 118-125, 2009.

DREW, C. P. et al. Bluetongue virus infection activates bovine monocyte-derived macrophages and pulmonary artery endothelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v. 136, p. 292–296, 2010.

DUNGU, B.; GERDES, T.; SMIT, T. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 40, p. 616-622, 2004.

ELBERS, A.R.W. et al. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 87, n. 1-2, p. 31-40, 2008.

ESCHBAUMER, M. et al. Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe-German field data and experimental infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 143, p. 189–195, 2010.

EUCLIDES FILHO, K. Supply chain approach to sustainable beef production from a Brazilian perspective. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 90, p. 55-61, 2004.

EUROPEAN COMMISSION OF HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE GENERAL. Possible use of vaccination against Bluetongue in Europe. 2014. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/index_en.htm. Acesso em: 12 mai. 2016.

EUROPEAN COMMISSION OF HEALTH & CONSUMER PROTECTION
DIRECTORATE GENERAL. Control measures bluetongue virus restricted zones-map
Disponível em:
http://ec.europa.eu/food/animals/docs/ad_controlmeasures_bt_restrictedzones-map). Acesso em: 15 jan 2017.

EVERMANN, J. F. Accidental introduction of viruses into companion animals by commercial vaccines. **The Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practise**, Philadelphia, v. 38, p. 919–929, 2008.

FARM NEWS. Maiores rebanhos e produtores de carne bovina no mundo. Disponível em:
<http://www.farmnews.com.br/analises-mercado/produtores-de-carne-bovina/>. Acesso em: 20 maio. 2017.

FELIPPE-BAUER, M. L. et al. New records of *Culicoides latreille* (Diptera:Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 33-38, 2008.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P.E.; Production systems - an example from Brazil. **Meat Science**, v. 84. p. 238-243, 2010.

FIRTH, A. E.; Bioinformatic analysis suggests that the Orbivirus VP6 cistron encodes an overlapping gene. **Virology Journal**, London, v. 5, p. 48, 2008.

FLANAGAN, M. M.; JOHNSON, S. J. The effects of vaccination of Merino ewes with an attenuated Australian bluetongue virus serotype 23 at different stages of gestation. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 72, p. 455–457, 1995.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. – Santa Maria, RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 888 p.

FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p.89-95, 2003.

FUNDAÇÃO FLORESTA: Disponível em: <http://fflorestal.sp.gov.br/unidades-de-conservacao/apas/apas-areas-de-protecao-ambiental-estaduais/> Acesso em: 25 fev. 2017.

GASPARINI, M. R. **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)**. 2014. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

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

GONZÁLEZ, M. C.; PÉREZ, N.; SIGER, J. Evidencia sexológica a virus de lengua azul en bovinos del estado Aragua, Venezuela. **Revista Facultad de Ciencias Veterinarias-UCV**, Caracas, v. 41, n.13, p. 3-12, 2000.

GORCHS, C.; LAGER, I. Actualizacion sobre el agente y la enfermedad. **Revista Argentina Microbiología**, Buenos Aires, v. 33, p. 122-132, 2001.

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

GUMM, I.D. et al. Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. **Veterinary Records**, London, v. 114, p. 635-638, 1984.

HAGE, J.E. et al. Bluetongue Virus in Lebanon. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 60 p. 390–394, 2013.

HALLIWELL, R. E. W. ; GORMAM, N. T. **Immunologia clínica veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1992.

HEMATI, B. et al. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 83, p. 8789-8799, 2009.

HENDRICKX, G. The spread of bluetongue in Europe. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 86, p. 34–39, 2009.

HOFMANN, M. A. et al. Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, 2008. Disponível em : <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/12/08-0818.htm>> .Acesso em: mar. 2015.

HOMAN, E.J. et al. Bluetongue virus infection in Costa Rica and Colombian cattle. **Progress in clinical and biological research**, New York, v. 178, p. 559-561, 1985.

HOWERTH, E. W.; GREENE, C. E.; PRESTWOOD, A. K. Experimentally induced bluetongue virus infection in whitetailed deer: coagulation, clinical pathologic, and gross pathologic changes. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 11, p. 1906–1913, 1988.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/>. **Área Territorial Oficial - Consulta por Unidade da Federação**. Acesso em: 9 mai. 2016.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

IEA (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA). Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

KAMPEN. H.; WERNER, D.; Three years of bluetongue disease in central Europe with special reference to Germany: what lessons can be learned? **Wiener Klinische Wochenschrift**, Austria, v. 122, p. 31–39, 2010.

KIRSCHVINK, N.; RAES, M.; SAEGERMAN, C. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. **Veterinary Journal**, London, v. 182, p. 244–251, 2009.

KOEPPEN, W. **Climatología**. México DF: Fondo de Cultura Económica. 1948.

KONRAD, P. A. et al. 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, p. 117-125, 2003.

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

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

LAGER, I.A. et al. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 40, n. 3, p. 89-93, 2004.

LARKIN, M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEBLANC, N., et al. Development of a real-time TR-PCR assay based on primer probe energy transfer for the detection of all serotypes of bluetongue virus. **Journal Virological Methods**, Amsterdam v. 167, p. 165-171, 2010.

LEGISA, D. et al. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. **The Journal of General Virology**, London, v. 94, p. 652-662, 2013.

LEGISA, D., GONZALEZ, F., SANTOS, M.D. Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean. **Virus Research**, Amsterdam, v. 182, p. 87–94, 2014.

LEMOS, F. K. A. **Evolução da bovinocultura de corte brasileira: elementos para a caracterização do papel da Ciência e da tecnologia na sua trajetória de desenvolvimento**. 2013. 239 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LEWERIN, S.S. et al. Infection with bluetongue virus serotype 8 in Sweden in 2008. **Veterinary Record**, London, v. 167, p. 165–170, 2010.

LIMA, M. S. **Caracterização do vírus da língua azul em ovinos, caprinos e cervídeos no Brasil**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2013.

LOBATO, Z.I.P. **Vírus de língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccinia e resposta imune**. 1996. 200 f. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

LOBATO, Z.I.P. Língua azul: a doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 4, p. 515-523, 1999.

LOBATO, Z. I. P. et al. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v. 59, p. 293-309, 1997.

LOBATO, Z. I. P. et al. Língua azul em ovinos e caprinos da região mineira da SUDENE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. **Anais**. Campo Grande: Associação Brasileira de Buiatria, 2001. p. 165.

LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C.; MATOS, A. C. D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 51, n. 4, p. 253-262, 2015.

LOPEZ, W. A.; NICOLETTI, P.; GIBBS E. P. J. Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 17, n. 2, p. 1982, 1985.

LORUSSO, A., et al. A novel bluetongue virus in healthy goats from Sardinia, Italy. In: Annual Meeting Epizone: Going Viral, 10, 2016, Madrid, Spain. **Anais**. 2016, p. 70.

LORUSSO, A. et al. Bluetongue virus serotypes 1 and 4 in Sardinia during autumn 2012: new incursions or re-infection with old strains? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 19, October, p. 81–87, 2013.

LYSYK, T. J.; DANYK, T. Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for bluetongue virus. **Journal of Medical Entomology**, Lawrence, v. 44, p. 741-751, 2007.

MA, J. G. et al. Seroprevalence and Risk Factors of Bluetongue Virus Infection in Tibetan Sheep and Yaks in Tibetan Plateau, China. **BioMed Research International**, New York, 2017. (*online first*).

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

MAAN, S. et al. Full genome characterisation of bluetongue virus serotype 6 from the Netherlands 2008 and comparison to other field and vaccine strains. **PloS One**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. e10323, 2010.

MAAN, S. et al. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17 n. 5, p. 886–889, 2011.

MAAN, S. et al. Full-genome sequencing as a basis for molecular epidemiology studies of bluetongue virus in India. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0131257, 2015.

MAAN, S. et al. Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. e0163014. 2016.

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

MACLACHLAN, N. J.; CONLEY, A. J.; KENNEDY, P.C. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 61, p. 643-651, 2000.

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

MACLACHLAN, N. J.; GARD, G. Clinical signs and pathology. In: Mellor P.; Baylis M.; Mertens P. P.C. (Eds.): **Bluetongue**. London: Academic Press, 2009. p. 285-293.

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

MACLACHLAN, N. J. Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practise**, Philadelphia, v. 26, p. 163-171, 2010.

MAIA, R. C. C. et al. Antibluetongue antibodies in dairy cattle from the State of Pernambuco, Brazil In: Brazilian Congress of Virology, 27, Mercosur Meeting of Virology 11, 2016. **Anais**. Pirenópolis, p.132.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Departamento de Defesa Animal. Instrução Normativa n. 2 de 10 de janeiro de 2001: **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Diário Oficial da União. 11 jan. 2001.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Portaria n. 50, de 19 maio de 1997, critérios técnicos para a classificação dos níveis de risco por febre aftosa das Unidades

da Federação. Brasília: MAPA. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 15 mai. 2016.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Comércio exterior brasileiro 2010**. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 20 jun. 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/04/mapa-investiga-caso-atipico-de-eeb>. Acesso em: 15 jan 2016.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2012/05/organizacao-de-saude-animal-muda-para-insignificante-o-status-sanitario-da-vaca-louca-no-pais>. Acesso em: 04 abr. 2014.

MATOS, A.C.D. et al. Genome Sequence of Bluetongue virus Serotype 17 Isolated in Brazil in 2014. **Genome Announcements**, Washington, v 4, n. 5, p. e01161-16, 2016.

MARTINS, M.S.N. et al. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da língua azul em búfalos do Pará. **O Biológico**, v. 73, p. 224-227, 2011.

MAYO, C. E. et al. Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 57, p. 277–281, 2010.

MECHAM, J. Detection and titration of bluetongue virus in *Culicoides* insect cell culture by an antigen-capture enzymelinked immunosorbent assay. **Journal Virological Methods**, Amsterdam, v. 135, p. 269-271, 2006.

MEENAMBIGAI, T. V. et al. A comparative study of the inclusion bodies in BHK 1 and Vero cells infected with bluetongue virus, Tamilnadu. **Journal Veterinary and Animal Science**, New York, v. 2, n. 6, p. 248-250, 2006.

MEHLHORN, H. et al. Bluetongue disease in Germany (2007–2008): monitoring of entomological aspects. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, p. 313–319, 2009.

MEISWINKEL, R. et al. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v.40, p.151–159, 2004.

MELLOR, P.S. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Heidelberg, v.162, p.143-161, 1990.

MELLOR, P. S. *Culicoides*: vectors, climate change and disease risk. **Veterinary Bulletin**, Dublin, v. 66, n. 4, p. 301-306, 1996.

MELLOR, P. S. Replication of arboviruses in insect vectors. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 123, p. 231-247, 2000.

MELLOR P. S.; WITTMANN, E. J. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001, **The Veterinary Journal**, London, v.164, p. 20–37, 2002.

MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P.P. Bluetongue. London UK: Elsevier Ltda, 2009.

MELO, C. B. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 19-20, 2000.

MELVILLE, L. F. Bluetongue surveillance methods in an endemic area: Australia. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 40, n. 3, p. 184-187, 2004.

MELVILLE L. et al. Forty years continuous monitoring for bluetongue virus at an Australian site of high arbovirus activity. What have we achieved? **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 51 n. 4, p. 263-267, 2015.

MENZIES, F. D. et al. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. **Veterinary Record**, London, v. 163, p. 203–209, 2008.

MERINO MENA, C. X. Identificación de anticuerpos precipitantes para el virus de la lengua azul en suero de ovinos de la parte alta y baja de la Provincia de Pichincha. Bachelor Thesis.

Facultad de Ingeniería Y Ciencias Agropecuarias. Universidad de las Américas, Quito, Ecuador, 2011.

MERTENS, P. P.; BROWN, F.; SANGAR, D. V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. **Virology**, New York, v. 135 n. 1, 207–217, 1984.

MERTENS, P.P. et al. *Orbivirus, Reoviridae*. London: Elsevier/Academic Press, 2005, p. 466–483.

MERTENS, P. P. C.; ATTOUI, H.; MELLOR, P.S. *Orbivirus*. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). **Encyclopedia of Virology**, Oxford: Elsevier, 2008, p. 454-465.

MO, C. L. et al. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in central America and the caribbean. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 55, p. 211-215, 1994.

MOHANDAS, S.S. Development of reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bluetongue viruses. **Journal Virological Methods**, Amsterdam, v. 6, p. 222, 2015.

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. A.; VIANA, F. C. Teste de imunodifusão para Língua Azul em alguns municípios do Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 9., 1980. **Anais**. Belo Horizonte: Núcleo de Acessoramento à Pesquisa, 1980, p. 83.

MULLENS, B. A.; HOLBROOK, F. R. Temperature effects on the gonotrophic cycle of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 7, p. 588-591, 1991.

MURRAY, M. D. Potential vectors of bluetongue in Australia. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 51, p. 216-220, 1975.

MURRAY, P. K.; EATON B. T. Vaccines for Bluetongue. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 73, p. 207-210, 1996.

NEGRI FILHO, L.C. et al. Detection of bluetongue virus antibodies in cattle of porto nacional city, Tocantins, Brazil. In: Brazilian Congress of Virology 27., Mercosur Meeting of Virology 11., 2016, Pirenópolis, Goiás, Brazil. **Anais.**, Pirenópolis 2016, p.127.

NICHOLAS, K.B., NICHOLAS, H.B.; DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: Analysis and visualization of genetics variation. **EMBNEW News**, v. 4, p. 14, 1997.

NOGUEIRA, A.H.C. et al. Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Língua azul (BTV) em ovinos da região Noroeste do Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 20. São Paulo, 2008. **O Biológico**, São Paulo, v. 69, p.115, 2008.

NOGUEIRA, A.H.C. et al. Detecção de anticorpos contra o vírus da língua azul em ovinos na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia v. 10, p. 1271-1276, 2009.

NOGUEIRA, A.H.C. et al. Prevalence of bluetongue serotype 4 in cattle of the state of São Paulo, Brazil. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 52, n. 3-4, p. 319-323, 2016.

NOMIKOU, K. et al. Evolution and phylogenetic analysis of full-length VP3 genes of Eastern Mediterranean bluetongue virus isolates. **PloS One**, San Francisco, v. 4 n .7, p. e6437. 2009.

NOMIKOU, K. et al. Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 11 n. 8, p. e1005056. 2015.

ODEON, A. C.; SCHORE, C. E.; OSBURN, B. I.; The role of cell mediated immunity in the pathogenesis of bluetongue virus serotype 11 in the experimental infection of vaccine/sensitized calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 20 p. 219-213, 1997.

OIE. World Organisation for Animal Health (2000). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial animals. Paris. 3rd Ed. <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals> Acesso em: 15 jan 2016.

OIE. World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (2008). Chapter 2.1. 9. Bluetongue virus. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf. Acesso em: mar. 2014.

OIE. World Organisation for Animal Health. Bluetongue and Epizootic Haemorrhagic Disease. Available 2012 Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf Acesso em: 1 Ago. 2015.

OIE. World Organisation for Animal Health. Bluetongue and Epizootic Haemorrhagic Disease. Available 2015 Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/.pdf>> Acesso em: 1 Ago. 2015.

OSBURN, B.I. Bluetongue virus. Veterinary clinics of North America. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, Philadelphia, v.10, n.3, p.547-560, 1994 a.

OSBURN, B.I. The impact of bluetongue virus on reproduction. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.17, n.3/4, p.189-196, 1994 b.

OSBURN, B.I. Third international symposium on bluetongue. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v.40, n.3, 2004.

PARSONSON, I. M. Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. **Current Topics on Microbiology and Immunology**, Heidelberg, v. 162, p. 119-141, 1990.

PELLEGRIN, A. O. et al. Doenças da reprodução em bovinos no Pantanal: ocorrência de animais soropositivos para os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina e vírus e língua azul. Corumbá: Embrapa Pantanal, v. 20, (**comunicado técnico**), 1997, p.7.

PEREZ, A. M. et al. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 56, p. 63-74, 2002.

PITUCO, E.M. Febre Aftosa. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1/2, p. 25-28, 2006.

PULLINGER, G.D. et al. Identification of the Genome Segments of Bluetongue Virus Serotype 26 (Isolate KUW2010/02) that Restrict Replication in a *Culicoides sonorensis* Cell Line (KC Cells). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 2, p.e0149709, 2016.

RADOSTITS, O. M. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 8th ed. London: **Bailliere Tindall**, p. 1028–1033, 1994.

RAMAKRISHNAN, M.A. et al. Immune response and protective efficacy in sheep immunised with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 41, n. 3, p. 149-155, 2005.

RATINIER, M. et al. Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7 n. 12, p. e1002477, 2011.

REDDY, Y. K. M. et al. Development and evaluation of inactivated pentavalent adjuvanted vaccine for Bluetongue. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 87 p. 434–436, 2010.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal Hygiene**, Cleveland, v. 27, n.3, p. 493-497, 1938.

RIET-CORREA, F. et al. Viroses confundíveis com Febre Aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, London, v.31, n. 2, p.127-131, 2003.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, B. et al. Orbiviruses in the Mediterranean Basin: updated epidemiological situation of bluetongue and new methods for the detection of BTV serotype 4. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 55, p. 205–214, 2008.

ROEHE, P.M. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1., Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 1998. p.89-96.

RONDEROS, M. M. et al. La importancia sanitaria de los jejenos del género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) em la Argentina. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 601-612, 2003.

RONDEROS, M. M.; GRECO, N. M.; SPINELLI, G. R. Diversity of biting midges of the genus *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) in the area of the Yacyretá Dam Lake between Argentina and Paraguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 19-24, 2003.

ROY, P. Bluetongue virus proteins. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 12, p. 3051–3064, 1992.

ROY, P. *Orbivirus*. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). **Encyclopedia of Virology**. Oxford: Elsevier, 2008. p. 328-335.

ROY, P.; NOAD, R. Bluetongue virus assembly and morphogenesis. In: Roy, P. (Ed.): Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**., Berlin, Springer, 2006, p. 87–116.

SAEGERMAN, C.; BERKVEN, D.; MELLOR, P. S. Bluetongue epidemiology in the European union. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, p. 539–544, 2008.

SAEGERMAN, C. et al. The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype 8 infection on reproductive performance in sheep. **Veterinary Journal**, London, v. 87, p. 72–80, 2011.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A. et al. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 in Dutch dairy herds in 2007. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. 31–35, 2010.

SANCHEZ-CORDON, P. J. et al. Immunohistochemical detection of bluetongue virus in fixed tissue. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 143, p. 20-28, 2010.

SARAIVA, J. F. Flebotomíneos (Díptera: Phlebotomidae) coletados em um assentamento rural no estado do Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 1, n. 1, p. 59-63, 2011.

SAVINI, G. et al. Vaccines against bluetongue in Europe. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, p. 101-120, 2008.

SAVINI, G. et al. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 133, p. 1–8, 2009.

SAVINI, G. et al. Epizootic haemorrhagic disease. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 91, p. 1–17, 2011.

SAVINI, G. Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: a retrospective analysis in Italy. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 69-74, 2014.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO - São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://agricultura.sp.gov.br/noticias/premio-destaca-a-importancia-historica-economica-e-social-da-bovinocultura-para-sao-paulo>>. Acesso em: 15 jan 2016.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO: CENSO AGROPECUÁRIO – LUPA 2008 Disponível em: <<http://www.agricultura.sp.gov.br/programas-e-projetos/censo-agropecuário-lupa/>>. Acesso em: 10 jan 2016.

SCHMAHL, G. Pilot study on deltamethrin treatment (Butox, Versatrine) of cattle and sheep against midges. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, p. 809–813. 2009.

SCHWARTZ-CORNIL, I. et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Veterinary Research**, Chicago, v. 39, p. 46, 2008.

SILVA, C. S. et al. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I. Região Norte: Município de Campo dos Goytacazes. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 349-358, 2001.

SILVA, F. J. F. **Estudos de ocorrência da língua azul em São Paulo: Comissão de estudos do Ministério da Agricultura. Portaria Ministerial** [relatório] n.150, 1978.

SILVA, M. X. **Soroprevalência da Língua Azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades do Ceará**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2002.

SPERLOVA, A.; ZENDULKOVA, D. Bluetongue: a review. **Veterinarni Medicina**, Praga, v. 56, n. 9, p. 430–452. 2011.

STEWART, M. et al. Characterisation of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. **Journal of General Virology**, London, v. 96, n. 11, p. 3280-3293, 2015.

STOTT, J. L.; OSBURN, B. I.; ALEXANDER, L. *Ornithodoros coriaceous* (pajaroello tick) as a vector of bluetongue virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, p. 1197–1199, 1985.

SUN, E. C. et al. Emergence of a Novel Bluetongue Virus Serotype, China 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 63, n. 6, p. 585-589, 2016.

TABACHNICK, W. J.; HOLBROOK, F. R. The *Culicoides variipennis complex* and the distribution of the bluetongue viruses in the United States. **Proceedings of the USA Animal Health Association**, Saint Joseph, v. 96, p. 207-212, 1992.

TAMAYO R. et al. First report of bluetongue antibody in Chile. **Progress in Clinical and Biological Research Journal**, New York, v. 178, p. 555-558, 1985.

TAMURA, K. et al. molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THIRY, E. et al. Bluetongue in northern Europe. **Veterinary Record**, London, v. 159, p. 327, 2006.

THOMAS, F. C.; RANDALL, G. C.; MYERS, D. J. Attempts to establish congenital bluetongue virus infections in calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 50, p. 280–281, 1986.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 3th ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. p. 610.

TOMICH, R. G. P. et al. Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e cervos campeiros no pantanal sul-matogrossense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p.1222-1226, 2009.

TRINDADE, R. L.; GORAYEB, I. S.; (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides), luego de la estación de lluvias, en la Reserva de Desarrollo Sostenible Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil, **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, n. 2, p.121-30, 2010.

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 U.K.** (DEFRA), 25 p 2002.

VANBINST, T. et al. A duplex real-time RT-PCR for detection of bluetongue virus in bovine semen. **Journal Virological Methods**, Amsterdam, v. 169, p. 162-168, 2010.

VENDITTI, L.L.R. **Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo. 2009.

VERDEZOTO, J. et al. Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. **Transboundary Emerging Disease**, Berlin, p. 1–4, 2017 (*online first*).

VERONESI, E. et al. Life-history parameters of *Culicoides (Avaritia) imicola* Kieffer in the laboratory at different rearing temperatures. **Veterinary Parasitology**, Chichester, v. 163, p. 370–373, 2009.

VIAROUGE, C. et al. Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 174, p. 78-85, 2014.

WARD, M. P.; CARPENTER, T. E.; OSBURN, B. I. Host factors affecting seroprevalence of bluetongue virus infections of cattle. **American Journal of Veterinarian Research**, v. 55, n. 7, 1994.

WARD, M. P. Climatic factors associated with the prevalence of bluetongue virus infection of cattle herds in Queensland, Australia. **Veterinary Record**, London, v.134, p. 407-410, 1994.

WARD, M. P.; THURMOND, M.C. Climatic factors associated with risks of seroconversion of cattle to bluetongue viruses in Queensland. **Preventive Veterinary Medical**, v. 24, p.129-136, 1995.

WECHSLER, S. J.; MCHOLLAND, L. E.; TABACHNICK, W. J. Cell lines from *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) support replication of bluetongue virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 54, p. 385–393, 1989.

WELLBY, M. et al. Effect of temperature on survival and rate of virogenesis of African horse sickness virus in *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) and its significance in relation to the epidemiology of the disease. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 86, p. 715–720, 1996.

WILBUR, L. A. et. al. Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Ithaca, v. 204, p. 1762–1765, 1994.

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

WILSON, W. C. A multiplex real time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of bluetongue virus and Epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 21, p. 760-770, 2009.

WILSON, A. J.; MELLOR, P. S. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, n. 1, p.69–77, 2008:

WILSON, A. J.; MELLOR, P. S. Bluetongue in Europe: past, present and future. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 364, n. 1530, p. 2669–2681, 2009.

WITTMANN, E.T.; BAYLIS, M. Climate change: effects on *Culicoides* – transmitted viruses and implication for UK. **Veterinary Journal**, London, v. 160, p. 107-117, 2000.

WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus infected semen. **Theriogenology**, New York, v. 65, p. 247-274, 2006.

WRIGHT, I. M. **Serological and genetic characterisation of putative new serotypes of bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus isolated from an Alpaca**. South Africa: North-West University, Potchefstroom Campus; 2013.

ZIENTARA S. et al. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, p. 2123-2125, 2014.

ZIENTARA, S.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. Control of bluetongue in Europe. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.165, n.1-2, p. 33-37, 2013.

APÊNDICE-A



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

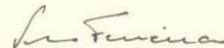
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 31/07, sobre o Projeto de Pesquisa: "**Isolamento, identificação e estudo molecular do vírus língua azul a partir de amostra de sangue e sêmen de ruminantes do Estado de São Paulo**", sob a responsabilidade da Dra. Edviges Maristela Pituco, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela *CETEA-IB* em 18 de julho de 2007.

São Paulo, 18 de julho de 2007.


Dra. Vera Cecília Annes Ferreira
Coordenadora da *CETEA-IB*

APÊNDICE-A

CETEA - IB

Registro

Número : 31/07

Livro : 01

Folha : 22

Data: 22/08/12

APÊNDICE - B

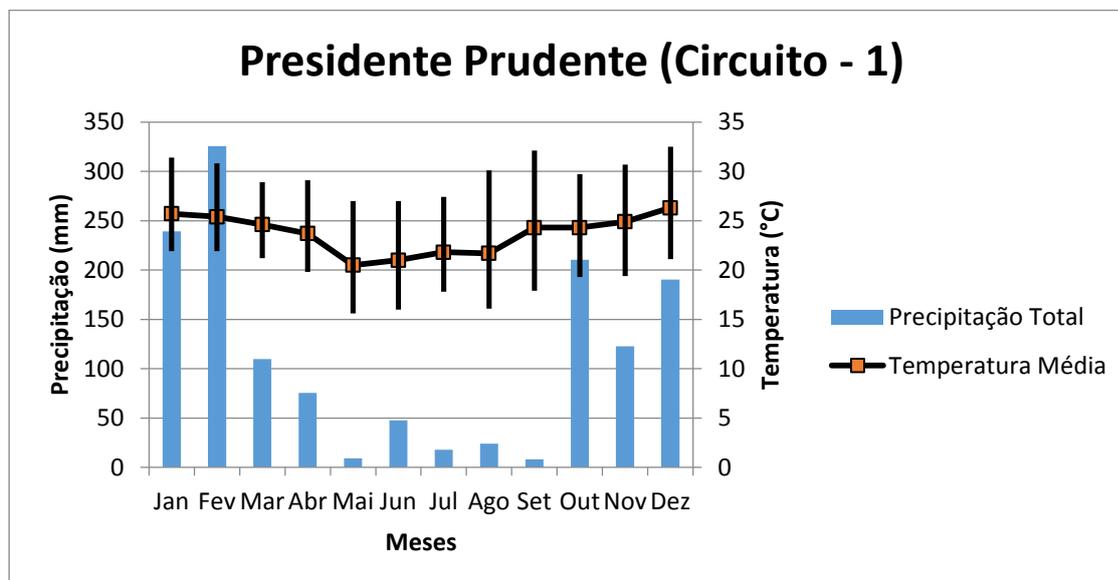
Temperaturas (°C) e precipitações (mm) médias do Estado de São Paulo obtidas a partir do registro de 26 estações meteorológicas no ano de 2011.

Município/ SP	Temperatura média (°C)	Precipitação (mm)
Andradina	24,4	1355,4
Araçatuba	24,3	1217,6
Assis	21,0	1356,2
Avaré	20,4	1367,2
Campinas	21,4	1675,9
Campos do Jordao	15,8	1835,0
Capão Bonito	17,7	1153,5
Catanduva	23,8	1235,7
Franca	21,9	1513,0
Itapetininga	19,6	1121,9
Itararé	16,3	1683,7
Jales	24,9	1736,5
Mococa	22,6	1539,1
Ourinhos	22,4	1158,9
Piracicaba	21,8	1708,8
Presidente Prudente	23,4	1364,0
Registro	22,2	1611,5
Riberão Preto	22,6	1505,6
Santos	22,7	2553,5
São Carlos	21,9	1555,0
São José do Rio Preto	23,5	1385,7
São Paulo	21,3	1590,2
Sorocaba	22,1	1305,4
Tupã	23,0	1276,5
Ubatuba	21,8	2996,6
Votuporanga	24,2	1206,3

APÊNDICE -C

Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Presidente Prudente (circuito -1) no período de 2006 a 2016.

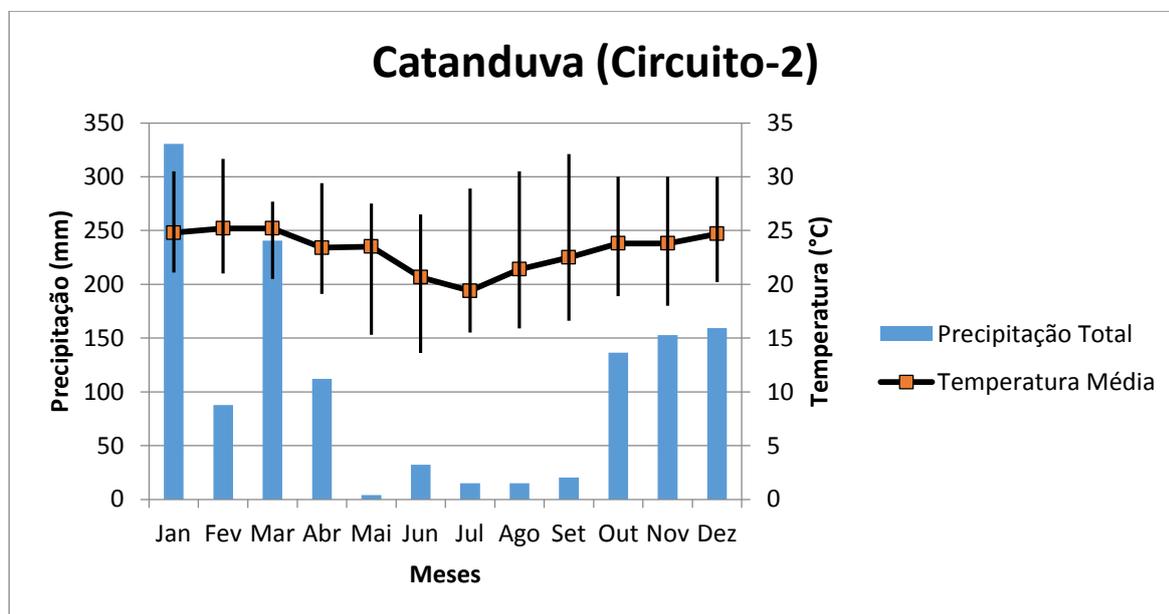
Meses	Precipitação Total (mm)	Temperatura Média (°C)
Jan	239,1	25,7
Fev	325,7	25,4
Mar	109,6	24,6
Abr	75,5	23,7
Mai	9,2	20,5
Jun	47,5	21
Jul	17,7	21,8
Ago	24	21,7
Set	8,1	24,3
Out	210,5	24,3
Nov	122,7	24,9
Dez	190,2	26,3
Média Anual	1379,8	21,65



Climograma de Presidente Prudente (circuito -1) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.

Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Catanduva (circuito -2) no período de 2006 a 2016.

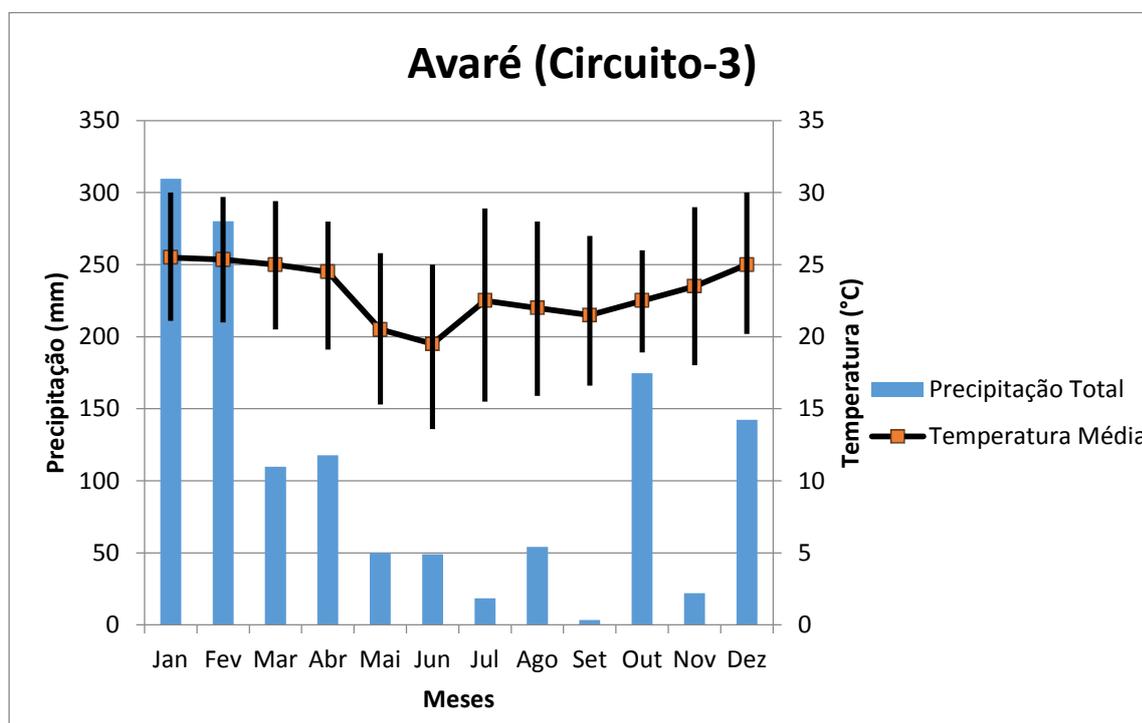
Meses	Precipitação (mm)	Total	Temperatura Média (°C)
Jan	330,6		24,8
Fev	87,8		25,2
Mar	240,6		25,2
Abr	112		23,4
Mai	4,0		23,5
Jun	32,1		20,65
Jul	15		19,4
Ago	15		21,4
Set	20,3		22,5
Out	136,3		23,8
Nov	152,9		23,8
Dez	159,4		24,7
Média Anual	1306		21,24



Climograma de Catanduva (circuito -2) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.

Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Avaré (circuito -3) no período de 2006 a 2016.

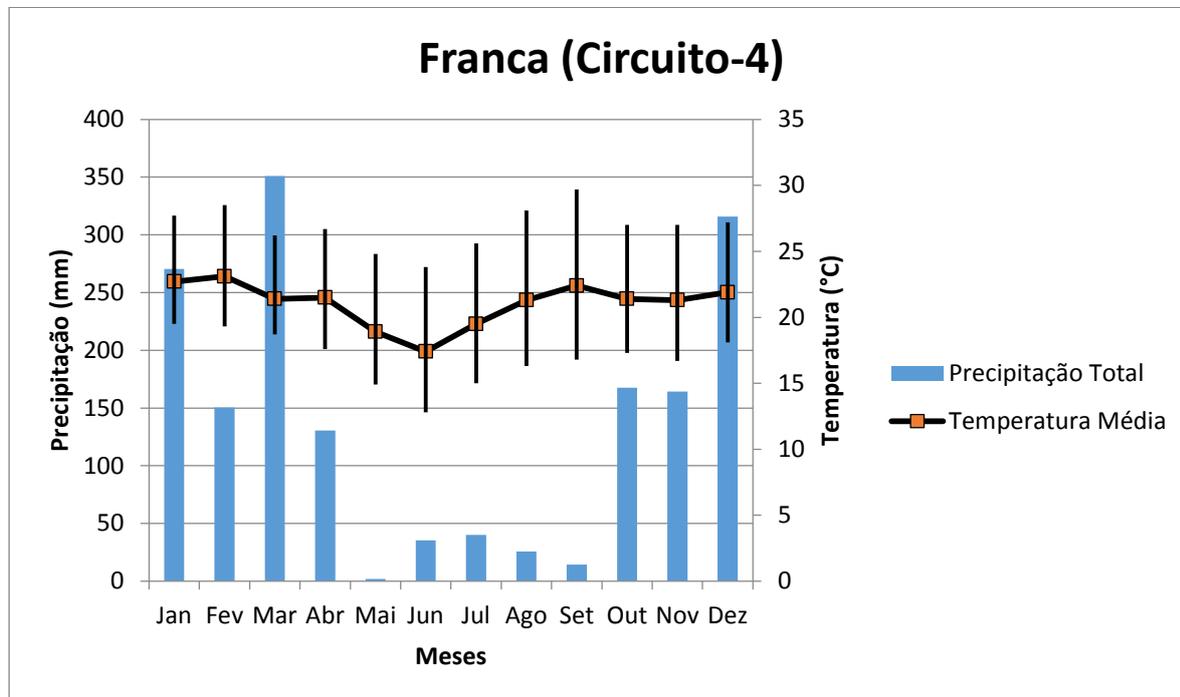
Meses	Precipitação (mm)	Total	Temperatura Média (°C)
Jan	309,6		25,5
Fev	280,2		25,35
Mar	109,8		25
Abr	117,8		24,5
Mai	50		20,5
Jun	49		19,5
Jul	18,6		22,5
Ago	54,2		22
Set	3,4		21,5
Out	174,6		22,5
Nov	22		23,5
Dez	142,4		25
Média Anual	1331,6		23,11



Climograma de Avaré (circuito -3) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.

Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Franca (circuito -4) no período de 2006 a 2016.

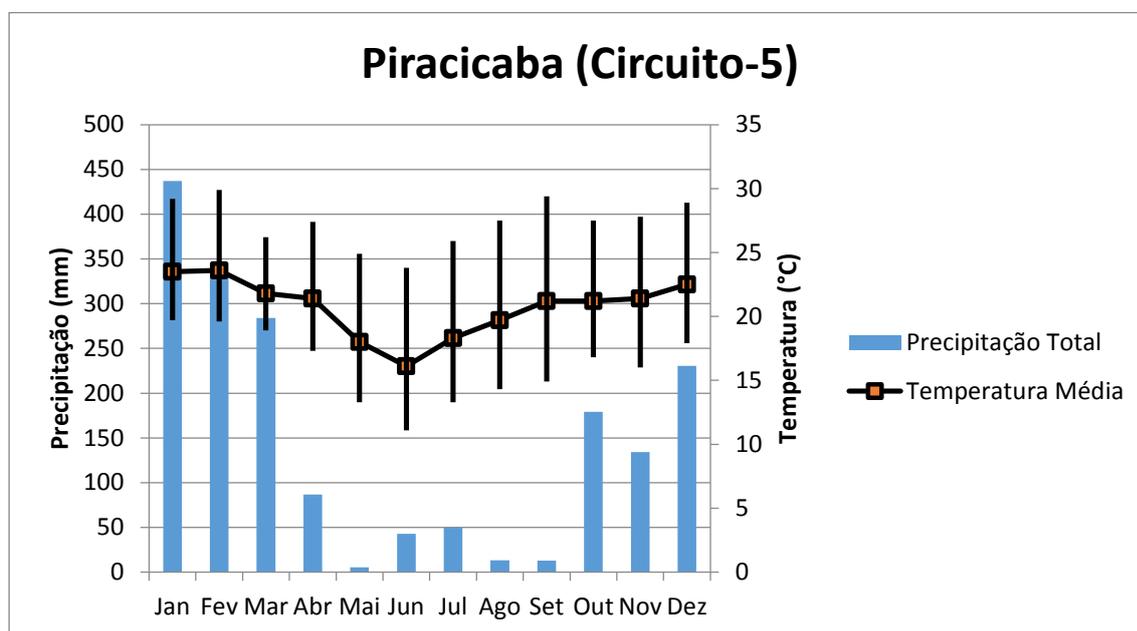
Meses	Precipitação Total (mm)	Temperatura Média (°C)
Jan	270,5	22,7
Fev	150,5	23,1
Mar	351	21,4
Abr	130,6	21,5
Mai	1,9	18,9
Jun	35,3	17,4
Jul	40	19,5
Ago	25,6	21,3
Set	14,4	22,4
Out	167,5	21,4
Nov	164,2	21,3
Dez	315,7	21,9
Média Anual	1667,2	21,9



Climograma de Franca (circuito -4) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.

Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Piracicaba (circuito -5) no período de 2006 a 2016.

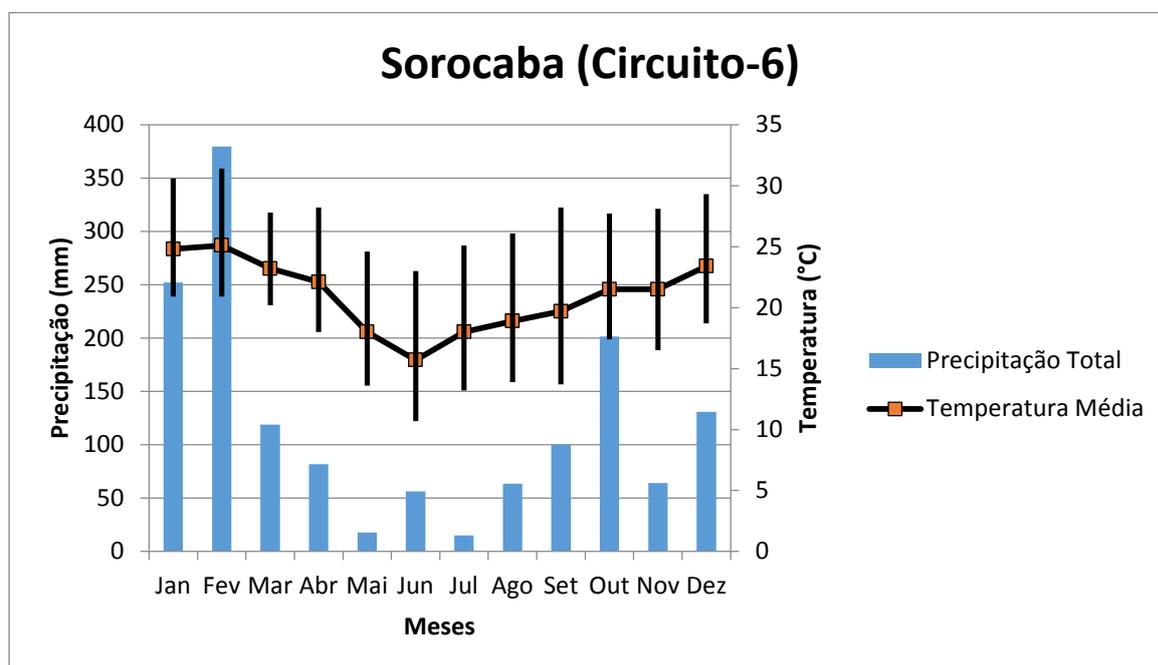
Meses	Precipitação Total (mm)	Temperatura Média (°C)
Jan	437	23,5
Fev	345,9	23,6
Mar	283,9	21,8
Abr	86,9	21,4
Mai	5,5	18
Jun	42,7	16,1
Jul	50	18,3
Ago	13,1	19,7
Set	13	21,2
Out	179	21,2
Nov	134,2	21,4
Dez	230,5	22,5
Média Anual	1642,8	19,0



Climograma de Piracicaba (circuito -5) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.

Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Sorocaba (circuito -6) no período de 2006 a 2016.

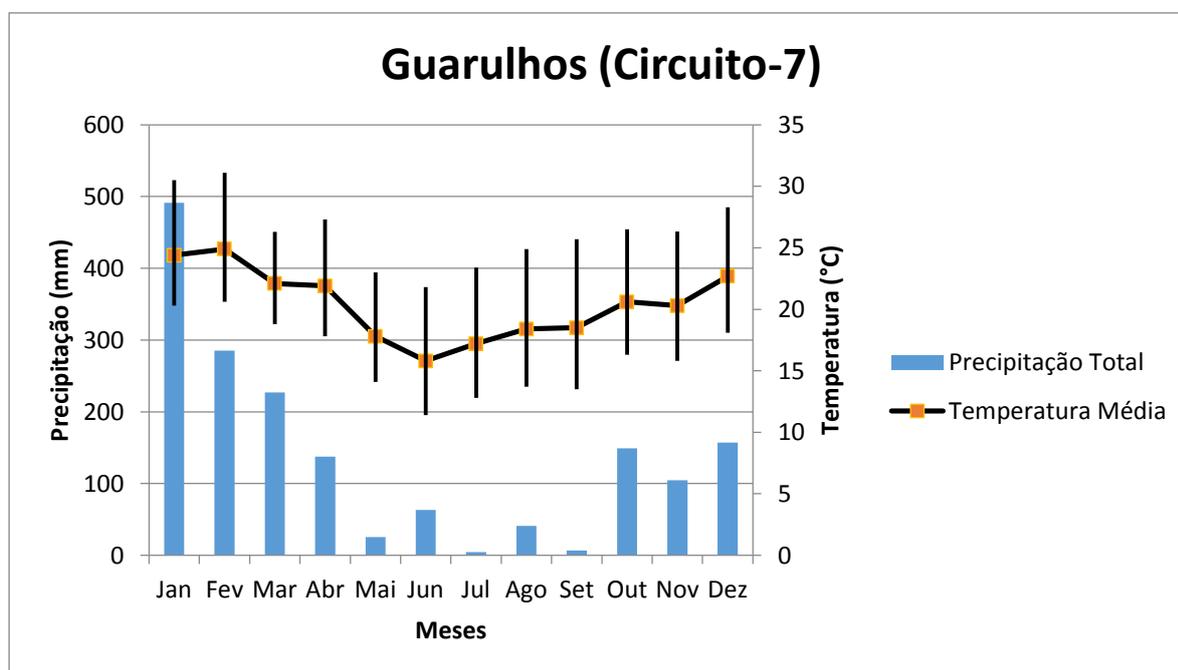
Meses	Precipitação (mm)	Total	Temperatura Média (°C)
Jan	252,1		24,8
Fev	379,5		25,1
Mar	118,8		23,2
Abr	81,8		22,1
Mai	17,9		18
Jun	56,3		15,7
Jul	15,2		18
Ago	63,6		18,9
Set	100		19,7
Out	201,6		21,5
Nov	64,3		21,5
Dez	130,9		23,4
Média Anual	1466,8		20,99



Climograma de Sorocaba (circuito -6) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.

Tabela 10- Tabela de médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de Guarulhos (circuito -7) no período de 2006 a 2016.

Meses	Precipitação Total (mm)	Temperatura Média (°C)
Jan	491,1	24,4
Fev	285,4	24,9
Mar	226,9	22,1
Abr	137,7	21,9
Mai	25,2	17,8
Jun	63,4	15,8
Jul	4,5	17,2
Ago	40,8	18,4
Set	6,6	18,5
Out	149,2	20,6
Nov	104,4	20,3
Dez	157,1	22,7
Média Anual	1692,3	20,38



Climograma de Guarulhos (circuito -7) com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total no período de 2006 a 2016.