



## Detección del virus de la lengua azul en ovinos por RT- PCR en tiempo real en diferentes sistemas de producción en San Martín, Perú



Alicia María López Flores <sup>a\*</sup>

Roni David Cruz Vasquez <sup>a</sup>

Víctor Humberto Puicón Niño de Guzmán <sup>a</sup>

Alicia Bartra Reátegui <sup>a</sup>

Orlando Ríos Ramírez <sup>a</sup>

Fredy Fabián Domínguez <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional de San Martín. Laboratorio de Sanidad Animal de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, San Martín, Perú.

\* Autor de correspondencia: [alicialopezflores@unsm.edu.pe](mailto:alicialopezflores@unsm.edu.pe)

### Resumen:

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia del Virus de la Lengua Azul (VLA) en ovinos, por la técnica reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Reversa (RT- PCR) en tiempo real. Se evaluaron 366 ovinos procedentes de las diez provincias de la región del Perú. La metodología empleada fue la toma de muestras sanguínea de la vena yugular del ovino, seguidamente se realizó el proceso de extracción y purificación de ARN con el kit QIAmp®, luego la transcripción reversa para obtener el ADNc, y finalmente realizar la RT- PCR en tiempo real, para lo cual se utilizó el kit SuperScript III platinum One- step qRT-PCR, siendo los iniciadores y sondas dirigidos al segmento 10 del gen NS3 del VLA. Los resultados de la prueba de RT-PCR en tiempo real revelaron dos ovinos positivos con valor de ciclo umbral (Ct) de 35.21 y 35.57, siendo la prevalencia de 0.54 % de ovinos positivos a VLA en sistema de crianza extensiva, con las condiciones del ambiente que favorecen el desarrollo del vector *Culicoide*. Se concluye que mediante la técnica RT-PCR en tiempo real, se confirma la presencia del VLA en esta región del Perú, lo que hace necesario futuros estudios para determinar la detección de otros serotipos potenciales de VLA en la

Amazonia peruana, con la finalidad de mejorar las estrategias de control de la enfermedad.

**Palabras clave:** ARN, Gen, Diagnóstico molecular, Rumiantes, Amazonia.

Recibido: 19/11/2020

Aceptado: 08/11/2021

## Introducción

El virus de la lengua azul (VLA), género *Orbivirus*<sup>(1)</sup>, sin envoltura, el genoma posee 10 segmentos de doble cadena de ARN, siete proteínas estructurales y cinco no estructurales<sup>(2)</sup>. La VP7 es una proteína de la cápside vírica<sup>(3)</sup>. La VP2 de la superficie del virión<sup>(4)</sup>. Además, los serotipos 9, 13, 18<sup>(5)</sup> y 27<sup>(6)</sup>, siendo el serotipo 28 en identificarse últimamente<sup>(7)</sup>.

La lengua azul es una enfermedad, no contagiosa y transmitido a través de la picadura de insectos *Culicoides*<sup>(8)</sup>. De los 1,357 especies de *Culicoides* en el mundo<sup>(9)</sup>, solo unos 30 han sido reportados como vectores<sup>(10)</sup>. Los vectores al alimentarse de un animal con VLA, estarán infectados toda su vida<sup>(11)</sup>, pueden infectar a los animales con variaciones en los signos clínicos<sup>(12)</sup>.

En ovinos, se manifiesta descarga nasal seromucosa, edema facial, fiebre trombo hemorrágico, coronitis y ulceración en labios y paladar duro<sup>(13)</sup>; la viremia suele detectarse entre 3 y 5 días después de la infección alcanzando puntos máximos febriles en el día 7<sup>(14)</sup>. Sin embargo, estos signos clínicos (p. ej., fiebre en ovinos y bovinos, salivación en bovinos, edema facial en ovinos) se observaron en rebaños infectados y no infectados, estos signos no son un indicativo de la enfermedad<sup>(15)</sup>. Así mismo, las lesiones macroscópicas son edema pulmonar, consolidación pulmonar craneo - ventral, lengua tumefacta y cianótica; y en mucosa ruminal lesiones hemorrágicas<sup>(16)</sup>. El bovino, caprino, bubalinos y otros rumiantes silvestres, actúan como reservorios del virus, siendo animales que podrían no manifestar signos clínicos<sup>(17,18,19)</sup>, sin embargo, existen reportes de mortalidad en bovinos con el serotipo 8 del VLA<sup>(20)</sup>; otros signos clínicos como la amaurosis que es la imposibilidad de pararse y la ausencia de reflejo de succión en terneros infectados<sup>(21)</sup>. Por lo tanto, los diferentes serotipos del VLA en rumiantes pequeños y grandes, indica su expansión enzoótica<sup>(22)</sup>. Así mismo, la transmisión del virus, huésped-vector son complejos, con una variedad de impulsores ecológicos<sup>(23)</sup>.

La epidemiología del VLA incluida en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE<sup>(24)</sup>. Ha generado brotes en Israel en el 2006, generando pérdidas de \$ 2.5 millones<sup>(25)</sup>, así mismo, un brote en Europa Occidental<sup>(26)</sup>. De este modo, ha

repercutido en un costo anual de \$ 3,000 millones, se convierte en una de las enfermedades de importancia económica<sup>(27)</sup>.

En la actualidad, esta enfermedad es a nivel mundial, excepto la Antártida<sup>(28)</sup>. Reportado en Brasil en ovinos<sup>(16)</sup>; en Sudán, en trastornos reproductivos en bovinos<sup>(29)</sup>; en Japón<sup>(30)</sup> e India, en una transmisión transplacentaria del VLA-1, en la etapa media de gestación en ovinos<sup>(31)</sup>. En Australia, el VLA, se originaron a partir del Sudeste Asiático<sup>(32)</sup>. Mientras en Reino Unido, los animales silvestres en zoológicos son susceptibles a arbovirus, actuando como hospederos nativos de los *Culicoides*<sup>(33)</sup>.

En Perú, el VLA ha sido reportado en ovinos, camélidos y en animales silvestres de áreas tropicales<sup>(34,35,36)</sup>. Los estudios preliminares, se realizaron en 1984 y 1987, encontrándose 88, 41 y 56 % de ovinos seropositivos a VLA provenientes de tres regiones (norte, centro y sur)<sup>(37)</sup> y 21 % de alpacas seroreactores de la región sur<sup>(38)</sup>. Estudios en *Tayassu tajacu* en Madre de Dios, se reporta un 7.5 % de muestras con anticuerpos específicos al VLA y el 29.2 % tuvieron anticuerpos al serogrupo VLA<sup>(34)</sup>. Recientemente, Navarro *et al*<sup>(35)</sup> confirmaron la presencia del virus en ovinos de crianza extensiva, además identificaron los *Culicoides* vectores de la enfermedad.

No obstante, la región San Martín en su clima tropical, es un ambiente óptimo para el vector y facilita sus vías de infección en hospedadores domésticos y silvestres; mencionado por Felipe-Bauer<sup>(39)</sup> quienes reportaron especies de *Culicoides*.

En relación al diagnóstico, la prueba de seroneutralización, es específica, pero su desventaja es la baja sensibilidad y costo<sup>(40)</sup>. No obstante, el ELISA competitivo es sugerido en llamas, rumiantes silvestres<sup>(41)</sup>, ovinos y caprinos<sup>(42)</sup>. En la actualidad, las pruebas recomendadas por la OIE para VLA son la RT-PCR, el ensayo de inmunodifusión en gel de agar y el ELISA competitivo<sup>(43,44)</sup>.

Siendo la RT-PCR en tiempo real para la detección rápida del VLA dirigido al Seg-1 / VP1<sup>(45,46)</sup>, Seg-2/VP2 y Seg-10/NS3<sup>(47)</sup>, es el método ampliamente utilizado<sup>(48)</sup>, en la detección de todos los serotipos de VLA<sup>(49)</sup>, basada en sonda de fluorescencia TaqMan<sup>(50,51,52,53)</sup>, para detectar VLA en muestras de ovinos infectados<sup>(54)</sup>. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue detectar al VLA en ovinos mediante RT-PCR tiempo real, considerándose la influencia de las características ambientales y presencia de la enfermedad.

## Material y métodos

### Lugar de estudio

La investigación se realizó en la región San Martín, Perú. Se recolectaron muestras sanguíneas en ovinos en condición de salud estable, en las 10 provincias de la región San Martín (Cuadro 1), en el periodo de agosto a diciembre de 2018.

**Cuadro 1:** Cantidad de ovinos muestreados por provincia idóneas para el desarrollo del vector

Provincias	N° Muestras
Moyobamba	9
Rioja	11
El Dorado	35
Lamas	41
Bellavista	74
Picota	41
Mariscal Cáceres	15
Huallaga	24
Tocache	30
San Martín	86
Total	366

### Recolección de muestra

Se recolectaron 366 muestras de sangre de la vena yugular de los ovinos seleccionados al azar, provenientes de 42 granjas. Para la recolección se emplearon agujas y tubos vacutainer al vacío con anticoagulante EDTA. Las muestras se transportaron en un contenedor refrigerado con gel refrigerante para su procesamiento en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Escuela Profesional de Agronomía - Facultad Ciencias Agrarias, Universidad Nacional San Martín.

Según el Censo del 2012<sup>(55)</sup>, la población es de 7,656 ovinos en todo el departamento de San Martín. Basado en esta población se calculó la muestra:

$$n = \frac{Z^2 pqN}{E^2(n-1) + Z^2 pq}$$

Donde:  $n$  es el tamaño de la muestra;  $Z$  es el nivel de confianza 95% = 1.96;  $p$  es la probabilidad de éxito 50%/100 = 0.5;  $q$  es la probabilidad de fracaso 50%/100 = 0.5;  $E$  es el nivel de error 5%/100 = 0.05;  $N$  es el tamaño de la población = 7656

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.5) (0.5) (7656)}{(0.05)^2(7656-1) + (1.96)^2(0.5) (0.5)}$$

$$n=366$$

Fórmula de la subpoblación muestral.

$$nh = \frac{Nh}{N} (n)$$

Nh= subpoblación o grupo; N= población total ; n= muestra total; nh=muestra de los grupos.

### Extracción de ARN

Para el procesamiento de la muestra sanguínea se llevó a centrifugar a 800 xg durante 10 min, seguidamente se extrajo el plasma y se adicionó PBS estéril, se invirtió el tubo varias veces para mezclar, volver a centrifugar a 800 xg durante 10 min para separar los glóbulos rojos del PBS. Para la extracción de ARN se utilizó el kit QIAmp®, marca Qiagen. El paso de extracción del ARN se realizó según los procedimientos especificados del fabricante. El producto final obtenido es ARN en Buffer, para finalmente seguir con la RT- PCR en tiempo real que tiene por diana el segmento 10 del VLA (Gen NS3).

### Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La RT- PCR en tiempo real es una prueba de elección para el diagnóstico. El método aquí descrito es recomendado por la OIE y Hofmann *et al*<sup>(56)</sup>, para detectar el segmento 10 del Gen NS3 del VLA. Para la obtención del ADNc mediante transcripción reversa y PCR en tiempo real se utilizó el kit SuperScript III platinum One- step qRT –PCR, marca Invitrogen, siendo las secuencias de los iniciadores para la detección del segmento 10 del gen NS3 del VLA. Las soluciones primarias del iniciador se diluyeron a una concentración de 20 pmol/μl, las secuencias nucleotídicas de los iniciadores: VLA\_IVI\_F 5'-TGG-AYA-AAG-CRA-TGT-CAA-A-3', VLA\_IVI\_R 5'-ACR-TCA-TCA-CGA-AAC-GCT-TC-3'<sup>(57)</sup>. La solución de la sonda para el gen NS3 del VLA, se diluyó hasta una concentración de 5 pmol/μl, la secuencia de la sonda: VLA\_IVI\_P 5'FAM-ARG-CTG-CAT-TCG-CAT-CGT-ACG- C-3' BHQ1.

Se adicionaron 0.5 μl de cada iniciador primario a concentración de 20 pmol/μl a cada pocillo, la placa se debe mantener sobre hielo. Seguidamente se adiciona 2 μl de muestras de ARN, tanto de la muestra diana como de los controles positivos y negativos, a los pocillos correspondientes de la placa siguiendo la distribución. La temperatura de desnaturalización fue 95 °C durante 5 min, y se mantuvieron sobre hielo

otros 3 min. Se preparó un volumen de la mezcla primaria<sup>(57)</sup> de la RT-PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda se incluyó en la mezcla primaria para obtener una concentración final de 0.2 pmol/μl por muestra. Se distribuyeron 22 μl de mezcla primaria en cada pocillo de la placa situado en el termociclador de tiempo real programado para una transcripción reversa y amplificación, detección mediante fluorescencia del ADNc.

### Condiciones de temperatura

La reacción fue llevada en light cycler 480 System Roche Applied Biosystems. Siguiendo el siguiente perfil térmico: Transcripción reversa 48 °C por 30 min, inactivación de la transcriptasa reversa o desnaturalización inicial 95 °C por 2 min, seguido, por 50 ciclos, amplificación 95 °C por 15 seg, 56 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg<sup>(57)</sup>.

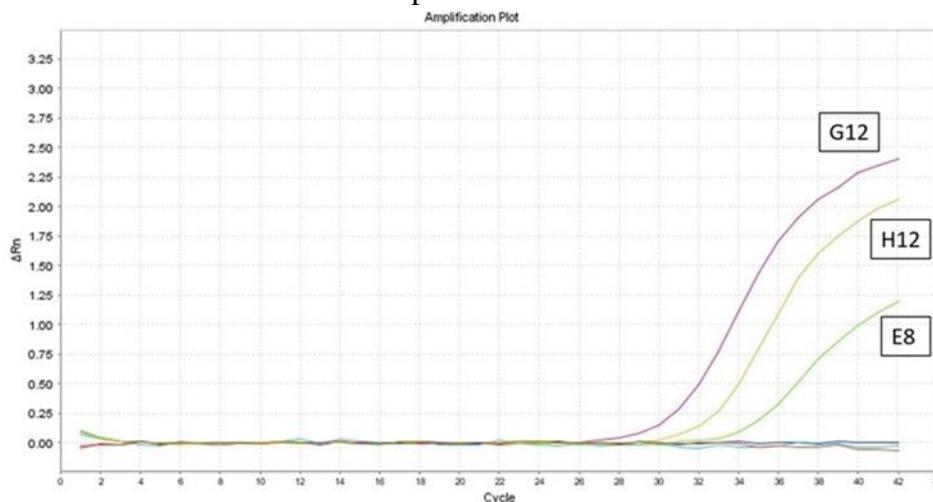
## Resultados y discusión

### Análisis RT-PCR en tiempo real

Los resultados de RT-PCR en tiempo real indicó que el 0.54 % (2/366) de las muestras fueron positivos al VLA. Para el primer individuo con código (E8), positivo a VLA presentó un valor de ciclo umbral (Ct) de alrededor de 35.21, con un valor de temperatura de disociación<sup>TM</sup> de 84 °C para VLA. Para la muestra con código (G12) – C+ VLA 1/10, presentó un Ct de 28.22 y 31.63 para la muestra con código (H12) – C+VLA 1/100. No se observó amplificación en el control negativo. Se evidencio la alta carga viral y la amplificación de un producto específico (Figura 1).

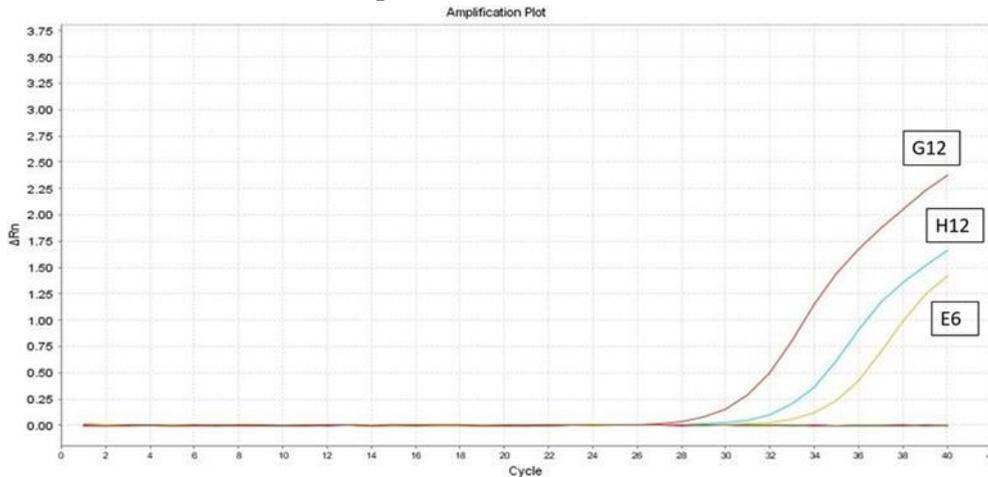
**Figura 1:** Resultados de la prueba de RT-PCR en tiempo real para el primer individuo positivo (E8), en la curva de amplificación, se observa con valor de Ct de 35.21.

Software Opticon Monitor v.3.0



Para el segundo individuo (E6), positivo a VLA presentó un valor de Ct de alrededor de 35.57, con un valor de temperatura de disociación<sup>TM</sup> de 84 °C. Para la muestra (G12)-C+VLA 1/10, presentó un Ct de 28.81 y 32.72 para la muestra (H12)- C+VLA 1/100. No se observó amplificación en el control negativo. Se evidenció la alta carga viral y la amplificación de un producto específico (Figura 2).

**Figura 2.** Resultados de la prueba de RT-PCR en tiempo real para el segundo individuo positivo (E6), en la curva de amplificación, se observan un valor Ct de 35.57. Software Opticon Monitor v.3.0.



Una revisión panorámica en América del Sur, mediante estudios serológicos para la detección de anticuerpos efectuados en bovinos, caprinos, ovinos y búfalos indica variadas prevalencias mínimas y máximas en los siguientes países: en Argentina (0–95 %)<sup>(58)</sup>, Brasil (1.22–89.69 %)<sup>(59,60)</sup>, Chile (0–19.6 %)<sup>(61,62)</sup>, Colombia (51.8–56 %)<sup>(63,64)</sup>, Ecuador (10 %)<sup>(65)</sup>, Guyana(0–56 %)<sup>(66)</sup>, Suriname (82–91 %)<sup>(66)</sup> y Venezuela (74.8–94.7 %)<sup>(67)</sup>; en el Perú, los estudios preliminares de 1984 y 1987 reportaron una seroprevalencia de 87.5, 41 y 55.5 % al VLA en ovejas del norte, centro y sur de la sierra del país<sup>(37)</sup>. En la presente investigación, se detectó el genoma viral del VLA, siendo la prevalencia de 0.54 % en sueros de ovinos mediante la RT-PCR en tiempo real, que confirma la presencia epidemiológica de este virus en esta región. Las zonas donde se detectaron los animales positivos se encuentran muy cerca de afluentes de agua como el río Sisa y la quebrada de Ishangayacu. Siendo las sensibilidades ambientales como componente clave de la capacidad del vector<sup>(68)</sup>.

Asimismo, es posible que la infección por el VLA en los ovinos muestreados haya sido subclínica, ya que los animales estuvieron en condiciones normales. Esto se explica según Maclachlan *et al*<sup>(69)</sup>, porque el desarrollo de los signos clínicos de la enfermedad depende si la infección es endémica o no; como consecuencia, los animales presentan anticuerpos, pero rara vez presentan signos clínicos. Esto es posiblemente porque en el ovino el periodo de viremia raramente persiste por más de 14 días, a diferencia del bovino cuya viremia puede ser de hasta 90 a 120 días.

Tal como lo menciona Navarro<sup>(36)</sup>, el Perú es uno de los países predisponentes a presentar la enfermedad de VLA, ya que posee diversos ecosistemas propicios para el desarrollo de *Culicoides*. Se considera necesario la determinación de la seroprevalencia del VLA en zonas ganaderas, identificar los diversos serotipos, levantar un mapa de la ubicación de las diversas especies de *Culicoides spp.*, en las diferentes áreas geográficas y altitudes, y determinar las zonas endémicas.

### Entorno de los ovinos positivos a VLA

Se realizó una evaluación de los alrededores de las granjas para observar el hábitat del vector *Culicoide*. Encontrándose que los animales positivos a VLA están cerca de afluentes de agua, lo que contribuye con desarrollo del vector, (Cuadro 2). Por otra parte, los ovinos positivos fueron de la raza Pelibuey, sin embargo, no es determinante la predisposición por la raza. Además, la crianza extensiva de los ovinos permite su crianza junto a los vacunos, gallinas, perros y caballos. En las encuestas realizadas los propietarios de las granjas extensivos, intensivos y semi-intensiva no desparasitan a sus animales, ni fumigan por la presencia de moscas, mosquitos o zancudos.

**Cuadro 2:** Entorno de los ovinos positivos al VLA

Provincia	Distrito	Ubicación de la granja	Sistema de explotación	Entorno de la granja	Raza	Condición corporal
Bellavista	San Pablo	Sector Angélica	extensivo	Margen izquierda del río Sisa	Pelibuey	3
Bellavista	San Pablo	Caserío de San Ignacio	extensivo	Margen izquierda de la quebrada Ishangayacu	Pelibuey	2.5

Estudios epidemiológicos, indican que el VLA existe en una extensa zona en el mundo entre los 40° latitud norte y 35° latitud sur, con ecosistemas tropicales, subtropicales y templados<sup>(70)</sup>, coincidiendo estas características con la región San Martín.

Los primeros estudios de la presencia del vector transmisor del VLA en nuestra región se dieron con Felipe-Bauer *et al*<sup>(39)</sup>, quienes identificaron cinco especies de *Culicoides* vectores del virus. De igual manera, Navarro *et al*<sup>(35)</sup>, de los 7,930 mosquitos capturados, el 94.8 % fueron identificados como *Culicoides insignis*, además se confirma la presencia del VLA en ovinos en la región Pucallpa<sup>(36)</sup>.

Por otra parte, el vector *Culicoide* suele desarrollarse en zonas donde existen ciertos tipos de conductores como el uso de la tierra, el comercio, la crianza de animales y la presencia de animales silvestres como reservorio del VLA; este último se refuerza con

el trabajo que realizaron Rivera *et al*<sup>(34)</sup>, quienes encontraron un 7.5 % de huanganas (*Tayassu pecari*) positivos al VLA en la región Madre de Dios.

El presente trabajo de investigación es el primero que se desarrolló en toda la región San Martín, donde los resultados mediante RT-PCR en tiempo real dan la presencia VLA. Felipe-Bauer *et al*<sup>(39)</sup> mencionan haber encontrado el vector *Culicoides* del virus. Por lo tanto, se requiere detectar otros serotipos existentes de VLA en animales domésticos y silvestres de la región que son susceptibles o reservorios de la enfermedad.

### Sistemas de explotación

En el sistema de explotación los productores optan en su mayoría por un sistema extensivo de crianza de ovinos en la Región San Martín (Cuadro 3).

**Cuadro 3:** Sistemas de producción

Provincias	Sistemas de explotación		
	Intensivo	Extensivo	Semi Intensivo
Moyobamba	0	9	0
Rioja	0	11	0
El Dorado	0	35	0
Lamas	0	27	14
Bellavista	0	74	0
Picota	0	29	12
Mariscal Cáceres	0	15	0
Huallaga	0	19	5
Tocache	0	20	10
San Martín	33	15	38
		Total	366

### Conclusiones e implicaciones

Se concluye que el VLA tiene una baja prevalencia en ovinos en la Región San Martín del Perú, sin embargo, es necesario estudios futuros para determinar la morbilidad y la detección de otros serotipos potenciales de VLA en el país, para dilucidar mejor el manejo de vectores y las estrategias de control de la enfermedad.

## Agradecimientos

El presente trabajo de investigación recibió el apoyo financiero del Instituto de investigación y Desarrollo de la UNSM–T, concurso de proyectos de tesis de pregrado, periodo 2018, con Resolución N° 611 -2018 – UNSM/CU – R/ NLU.

### Literatura citada:

1. Batten CA, Henstock MR, Steedman HM, Waddington S, Edwards L, Oura CA. Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics, pathogenesis and possible contact transmission in goats. *Vet Microbiol* 2013;162(1):62–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.014>.
2. Patel A, Roy P. The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res* 2014;(182):5-20. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.017.
3. Roy P. Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly, and release. *Adv Virus Res* 2005;64:69–123. <https://doi.org/10.1111/tbed.12625>.
4. Wilson WC, Hindson BJ, O'Hearn ES, Hall S, Tellgren-Roth C, Torres C, *et al.* A multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Bluetongue virus and Epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. *J Vet Diagn Invest* 2009;21(6):760-70. doi: 10.1177/104063870902100602. PMID: 19901276.
5. Verdezoto J, Breard E, Viarouge C, Quenault H, Lucas P, Sailleau C, *et al.* Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. *Transbound Emerg Dis* 2018;65(1):244-247. doi: 10.1111/tbed.12625. Epub 2017 Feb 26. PMID: 28239988.
6. Schulz C, Bréard E, Sailleau C, Jenckel M, Viarouge C, Vitour D, *et al.* Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *J Gen Virol* 2016;97(9):2073-2083. doi: 10.1099/jgv.0.000557. Epub 2016 Jul 19. PMID: 27435041.
7. Bumbarov V, Golender N, Jenckel M, Wernike K, Beer M, Khinich E, Zalesky O, Erster O. Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transbound Emerg Dis* 2020;67(1):171-182. doi: 10.1111/tbed.13338. Epub 2019;31469936.
8. Purse BV, Brown HE, Harrup L, Mertens PP, Rogers DJ. Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. *Rev Sci Tech* 2008;27(2):427-42. PMID: 18819670.
9. Borkent A, Willis WW. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Vol. 233. New York, USA: American Museum of Natural History. 1997.

10. Linley JR. Autogeny in the Ceratopogonidae: literature and notes. *Fla. Entomol* 1983;(66):228–234.
11. Maclachlan NJ, Zientara S, Wilson WC, Richt JA, Savini G. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses: recent developments with these globally re-emerging arboviral infections of ruminants. *Curr Opin Virol* 2019;34:56-62. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.005. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30654271.
12. Labadie T, Sullivan E, Roy P. Multiple routes of bluetongue virus egress. *Microorganisms*. 2020;27;8(7):965. doi: 10.3390/microorganisms8070965. PMID: 32605099; PMCID: PMC7409164.
13. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 2008;39(5):46. doi: 10.1051/vetres:2008023.
14. Foster NM, Luedke AJ, Parsonson IM, Walton TE. Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res* 1991;52(2):192–196. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1707246/>. Accessed Feb 17, 2020.
15. Elbers ARE, Backx A, Ekker HM, van der Spek AN, van Rijn PA. Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. *Vet Microbiol*;2021;129(1–2):156–162. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18164148/>.
16. Bianchi RM, Panziera, Welden FTC, Almeida GL, Cargnelutti JF, Flores EF, Kommers GD, Figuera RA. Clinical, pathological and epidemiological aspects of outbreaks of bluetongue disease in sheep in the central region of Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet Bras* 2017;37(12):1443-1452. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001200014>.
17. Wilson AJ, Mellor PS. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 27;364(1530):2669-81. doi: 10.1098/rstb.2009.0091. PMID: 19687037; PMCID: PMC2865089.
18. Lorca-Oró C, López-Olvera JR, Ruiz-Fons F, Acevedo P, García-Bocanegra I, Oleaga Á, Gortázar C, Pujols J. Long-term dynamics of bluetongue virus in wild ruminants: relationship with outbreaks in livestock in Spain, 2006-2011. *PLoS One*. 2014;18;9(6):e100027. doi: 10.1371/journal.pone.0100027. PMID: 24940879; PMCID: PMC4062458.
19. Lager IA. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital* 2004;40(3):89-93. PMID: 20419641.

20. Santman-Berends IM, van Schaik G, Bartels CJ, Stegeman JA, Vellema P. Mortality attributable to bluetongue virus serotype 8 infection in Dutch dairy cows. *Vet Microbiol* 2011;24;148(2-4):183-188. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.09.010. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20889271.
21. Vinomack C, Rivière J, Bréard E, Viarouge C, Postic L, Zientara S, *et al.* Clinical cases of Bluetongue serotype 8 in calves in France in the 2018-2019 winter. *Transbound Emerg Dis* 2020;67(3):1401-1405. doi: 10.1111/tbed.13466. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31883429.
22. Maan S, Tiwari A, Chaudhary D, Dalal A, Bansal N, Kumar V, *et al.* A comprehensive study on seroprevalence of bluetongue virus in Haryana state of India. *Vet World* 2017;10(12):1464-1470. doi: 10.14202/vetworld.2017.1464-1470. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29391687; PMCID: PMC5771171.
23. Mayo C, McDermott E, Kopanke J, Stenglein M, Lee J, Mathiason C, Carpenter M, Reed K, Perkins TA. Ecological dynamics impacting bluetongue virus transmission in North America. *Front Vet Sci* 2020;17;7:186. doi: 10.3389/fvets.2020.00186. PMID: 32426376; PMCID: PMC7212442.
24. OIE. Listed diseases, infections and infestations 2021. <https://www.oie.int/es/enfermedad/lengua-azul/>. Accessed Jun 13, 2021.
25. Kedmi M, Van Straten M, Ezra E, Galon N, Klement E. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J Dairy Sci* 2010;93(6):2486-2495. doi:10.3168/jds.2009-2850.
26. Velthuis AG, Saatkamp HW, Mourits MC, de Koeijer AA, Elbers AR. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev Vet Med* 2010;1;93(4):294-304. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.007. Epub 2009 Dec 3. PMID: 19962204.
27. Rushton J, Lyons N. Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Vet Ital* 2015;51(4):401-406. doi: 10.12834/VetIt.646.3183.1. PMID: 26741252.
28. Van der Sluijs MT, de Smit AJ, Moormann RJ. Vector independent transmission of the vector-borne bluetongue virus. *Crit Rev Microbiol* 2016;42(1):57-64. doi: 10.3109/1040841X.2013.879850. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24645633.
29. Elhassan AM, Babiker AM, Ahmed ME, El Hussein AM. Coinfections of Sudanese dairy cattle with bovine herpes virus 1, bovine viral diarrhoea virus, bluetongue virus and bovine herpes virus 4 and their relation to reproductive disorders. *J Advanced Vet Anim Res* 2017;3(4):332-337. <http://doi.org/10.5455/javar.2016.c169>.

30. Kato T, Shirafuji H, Tanaka S, Sato M, Yamakawa M, Tsuda T, Yanase T. Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in Southern Japan from 2003 to 2013. *Transbound Emerg Dis* 2016;63(6):e160-e172. doi: 10.1111/tbed.12324. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25597441.
31. Saminathan M, Singh KP, Khorajiya JH, Dinesh M, Vineetha S, Maity M, *et al.* An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Vet Q* 2020;40(1):258-321. doi: 10.1080/01652176.2020.1831708. PMID: 33003985; PMCID: PMC7655031.
32. Kedmi M, Van Straten M, Ezra E, Galon N, Klement E. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J Dairy Sci* 2010;93(6):2486-2495. doi:10.3168/jds.2009-2850.
33. England ME, Pearce-Kelly P, Brugman VA, King S, Gubbins S, Sach F, *et al.* *Culicoides* species composition and molecular identification of host blood meals at two zoos in the UK. *Parasit Vectors* 2020;16;13(1):139. doi: 10.1186/s13071-020-04018-0. PMID: 32178710; PMCID: PMC7076997.
34. Rivera H, Cárdenas L, Ramírez M, Manchego A, More J, Zúñiga A, *et al.* Orbivirus infection in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from Madre de Dios region, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 2013;24(4):544–550. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i4.2738>.
35. Navarro D. Identificación de *Culicoides* spp, como vectores del virus Lengua Azul en áreas de ovinos seropositivos de Pucallpa, Ucayali [tesis maestría]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
36. Navarro MD, Rojas M, Jurado PJ, Manchego SA, Ramírez VM, Castillo EA, *et al.* Molecular detection of Bluetongue virus in *Culicoides insignis* and sheep of Pucallpa, Perú. *Rev Investig Vet Perú* 2019;30(1):465–476. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15690>.
37. Rosadio RH, Evermann JF, De Martini JC. A preliminary serological survey of viral antibodies in peruvian sheep. *Vet Microbiol* 1984;10(1):91–96. doi: 10.1016/0378-1135(84)90059-2.
38. Rivera H, Madewell BR, Ameghino E. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res* 1987;48(2):189-191. PMID: 3826854.
39. Felipe-Bauer ML, Cáceres A, Silva CS, da Valderrama-Bazan W, Gonzales-Pérez A, Costa JM. New records of *Culicoides latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. *Biota Neotropica* 2008;8(2):33–38. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032008000200002>.

40. Singer RS, Boyce WM, Gardner IA, Johnson WO, Fisher AS. Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. *Prev Vet Med* 1998;35(4):265-282. doi:10.1016/s0167-5877(98)00067-1.
41. Afshar A, Heckert RA, Dulac GC, Trotter HC, Myers DJ. Application of a competitive ELISA for the detection of bluetongue virus antibodies in llamas and wild ruminants. *J Wild Dis* 1995;31(3):327-30. doi: 10.7589/0090-3558-31.3.327. PMID: 8592352.
42. Elmahi MM, Karrar ARE, Elhassan AM, Hussien MO, Enan KA, Mansour MA, El Hussein ARM. Serological investigations of Bluetongue Virus (BTV) among sheep and goats in Kassala State, Eastern Sudan. *Vet Med Int* 2020;2020:8863971. doi: 10.1155/2020/8863971. PMID: 33062245; PMCID: PMC7547342.
43. Saminathan M, Singh KP, Vineetha S, Maity M, Biswas SK, Manjunathareddy GB, *et al.* Virological, immunological and pathological findings of transplacentally transmitted bluetongue virus serotype 1 in IFNAR1-blocked mice during early and mid-gestation. *Sci Rep* 2020;10(1):2164. doi: 10.1038/s41598-020-58268-0.
44. Díaz-Cao JM, Lorca-Oró C, Pujols J, Cano-Terriza D, de Los Ángeles Rivalde M, Jiménez-Ruiz S, Caballero-Gómez J, García-Bocanegra I. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bluetongue virus in wild ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2020;70:101461. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101461. Epub 2020 Feb 29. PMID: 32151837.
45. Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, Anthony S, Darpel KE, Batten CA, *et al.* Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J Virol Meth* 2007;145(2):115-126. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.014>.
46. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Meth* 2007;140(1):115- 123. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.007>.
47. Van Rijn PA, Geurts Y, Van der Spek AN, Veldman D, Van Gennip RG. Bluetongue virus serotype 6 in Europe in 2008-emergence and disappearance of an unexpected non-virulent BTV. *Vet Microbiol* 2012;158(1):23-32. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.022.
48. Rojas JM, Rodríguez-Martín D, Martín V, Sevilla N. Diagnosing bluetongue virus in domestic ruminants: current perspectives. *Vet Med* 2019;(10):17–27. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S163804>.

49. Mulholland C, McMenamy MJ, Hoffmann B, Earley B, Markey B, Cassidy J, Allan G, *et al.* The development of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) assay using TaqMan technology for the pan detection of bluetongue virus (BTV). *J Virol Meth* 2017;(245):35–39. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.009>.
50. MacLachlan NJ. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet Ital* 2004;40(4):462–467. PMID: 20422570.
51. Mertens PPC, Maan NS, Prasad G, Samuel, AR, Shaw AE, Potgieter AC, Anthony SJ, Maan S. Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J Gen Virol* 2007;88(10):2811-2823. doi: 10.1099/vir.0.83023-0.
52. Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CA, Van Rijn PA, *et al.* A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol* 2009;139(1-2):1-23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.034>.
53. Maan NS, Maan S, Belaganahalli MN, Ostlund EN, Johnson DJ, Nomikou K, Mertens PP. Identification and differentiation of the twenty-six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PLoS One* 2012;7(2):e32601. doi: 10.1371/journal.pone.0032601. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22389711; PMCID: PMC3289656.
54. Lakshmi I, Putty K, Raut SS, Patil SR, Rao PP, Bhagyalakshmi B, *et al.* Standardization and application of real-time polymerase chain reaction for rapid detection of bluetongue virus. *Vet World* 2018;11(4):452–458. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.452-458>.
55. INEI. Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario [Internet]. IV Censo Nacional Agropecuario. 2012: <https://sigrid.cenepred.gob.pe/sigridv3/documento/906>. Consultado 21 May, 2021.
56. Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2008;14(12):1855-61. doi: 10.3201/eid1412.080818. PMID: 19046507; PMCID: PMC2634640.
57. Manual Terrestre de la OIE-2014.Lengua azul: Infección por el virus de la Lengua Azul. Capítulo 2.1.3.
58. Lager IA. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital* 2004;40(3):89-93. PMID: 20419641.

59. Cunha RG, de Souza DM, Texeira AC. Anticorpos precipitantes para o virus da lingua azul em soros de bovinos do estado do Rio de Janeiro. *Biológico*, São Paulo. 1982;48(4):99-103.
60. Melo CB, Oliveira AM, Castro RS, Lobato ZIP, Leite RC. Precipitating antibodies against the bluetongue virus in bovines from Sergipe, Brazil. *Cienc Vet Trop Recife* 1999;2(2):125-127.
61. Fundación Vida Silvestre Argentina (FVSA). Operativo de captura de venados de las pampas en campos del Tuyú. FVSA, Buenos Aires. 2004; [vidasilvestre.org.ar/pastizales/2\\_6.asp](http://vidasilvestre.org.ar/pastizales/2_6.asp). Consultado 9 Jul, 2004.
62. Tamayo R, Schoebitz R, Alonso O, Wenzel J. First report of bluetongue antibody in Chile. *Progr Clin Biol Res*1983;178:555-558.
63. Homan EJ, Lorbacher de Ruiz H, Donato AP, Taylor WP, Yuill TM. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Costa Rica and Northern Colombia. *J Hyg Camb* 1985;94:357- 363.
64. Homan EJ, Taylor WP, Lorbacher de Ruiz H, Yuill TM. Bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease of deer virus serotypes in northern Colombian cattle. *J Hyg Camb* 1985;95:165-172.
65. Lopez WA, Nicoletti P, Gibbs EPJ. Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Trop Anim Hlth Prod* 1985;17:82.
66. Gibbs J, Greiner E, Alexander F, King H, Roach C. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. *Vet Rec* 1984;114(26):635-638.
67. Gonzalez MC, Perez N, Siger J. Serologic evidence of bluetongue virus in bovines from Aragua State, Venezuela. *Rev Fac Cienc Vet UCV*2000;41(1-3):3-12.
68. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Binomics of temperate and tropical *Culicoides* Midge: Knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides* -Borne viruses. *Annu Rev Entomol* 2014;(60):373–392. <http://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020614>.
69. Maclachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol* 2009;141(1):1-16. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.04.003. Epub 2009 May 23. PMID: 19476953.
70. Mertens PP, Diprose J, Maan S, Singh KP, Attoui H, Samuel AR. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet Ital* 2004;40(4):426-37. PMID: 20422565.