

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM CERVÍDEOS NEOTROPICAIS
E BOVÍDEOS DOMÉSTICOS**

Aline Eyko Kawanami
Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM CERVÍDEOS NEOTROPICAIS
E BOVÍDEOS DOMÉSTICOS**

Aline Eyko Kawanami

Orientadora: Profa. Dra. Karin Werther

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutora em
Medicina Veterinária (Patologia Animal)**

2016

K21v Kawanami, Aline Eyko
Vírus da língua azul em cevêdeos neotropicais e bovídeos domésticos / Aline Eyko Kawanami. – – Jaboticabal, 2017
xx, 98 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Karin Werther
Banca examinadora: Edviges Maristela Pituco, Líria Hiromi Okuda, Hélio José Montassier, Maria da Glória Buzinaro
Bibliografia

1. Doença hemorrágica. 2. Diptera. 3. Ruminantes brasileiros. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM CERVÍDEOS NEOTROPICAIS E BOVÍDEOS DOMÉSTICOS

AUTORA: ALINE EYKO KAWANAMI

ORIENTADORA: KARIN WERTHER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Karin Werther

Profa. Dra. KARIN WERTHER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Edviges Maristela Pituco

Pesquisadora Doutora EDVIGES MARISTELA PITUCO
Instituto Biológico / São Paulo, SP

Liria Hiromi Okuda

Profa. Dra. LIRIA HIROMI OKUDA
Laboratório de Vírus de Bovídeos / Instituto Biológico de São Paulo

Helio José Montassier

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Maria da Glória Buzinaro

Profa. Dra. MARIA DA GLÓRIA BUZINARO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de dezembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE EYKO KAWANAMI – Nascida em 06 de outubro de 1984 em São Paulo – SP, filha de Yoshiaki Kawanami e Maria Mitsue Nishimoto Kawanami. É Médica Veterinária graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Câmpus de Jaboticabal, com ingresso em março de 2003 e término em dezembro de 2007. Fez Especialização em Residência Médico-Veterinária de Animais Silvestres pela Universidade Federal de Goiás durante o ano de 2009. É mestre pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração de Patologia Animal pela FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, com ingresso em março de 2010 e término em julho de 2012. Em agosto de 2012 ingressou no curso de doutorado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Animal pela mesma universidade.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem. Ou que seus planos nunca vão dar certo. Ou que você nunca vai ser alguém. (...) Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo. Quem acredita sempre alcança.”

Renato Russo

Dedico

Aos meus pais, Maria e Yoshiaki, às minhas irmãs Tatiana, Stephanie e Amanda, à minha avó Hama e à minha tia Kimiko, por sempre estarem ao meu lado e pelo amor e apoio incondicionais.

A todos os animais que fazem ou fizeram parte da minha vida, auxiliando no meu crescimento profissional e pessoal, e que são a minha paixão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por ter saúde e pelas pessoas maravilhosas que encontrei ao longo desses anos. Obrigada por todos os momentos de alegria e também pelos momentos difíceis, todos eles me tornaram a pessoa que sou hoje.

À Professora Dra. Karin Werther, por todos esses anos de ensinamentos durante a graduação e depois durante a pós-graduação. Muito obrigada por transmitir seus conhecimentos e pela orientação durante o mestrado e o doutorado. Obrigada pelos inúmeros “puxões de orelha”, sei que foram necessários e sempre tiveram por finalidade o meu bem. Obrigada também por ser um exemplo de pessoa sempre correta e ética e que nos inspira a ser assim, mostrando que sempre vale a pena trabalhar corretamente.

Agradeço o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq em forma de bolsa (Processo 140626/2013-1) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio à Pesquisa concedido (Processo 2015/22851-8).

Ao Professor Dr. Odair Aparecido Fernandes, do Departamento de Fitossanidade da FCAV - Unesp, Jaboticabal, por gentilmente ter cedido as armadilhas luminosas utilizadas nesse projeto e pela ajuda prestada todas as vezes em que foi solicitado.

À Maria Isabel P. A. Balbi, do Laboratório de Morfologia e Evolução de Diptera, do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), por ter realizado a identificação dos insetos do projeto. Obrigada também pela paciência e pela seriedade e ética que tem com seu trabalho.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, NUPECCE, em especial ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela cooperação no projeto. Aos amigos David Galindo, Jorge Morales e Luciana Diniz que também participaram de parte do experimento, me auxiliando quando necessário.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial à Dra. Edviges Maristela Pituco, que permitiu que parte das análises fosse realizada no Laboratório de Viroses de Bovídeos. Às pesquisadoras Dra. Líria H. Okuda, Adriana H. Nogueira e Eliana De Stefano pelos ensinamentos e ajuda prestada durante as análises. À Marcia Mayumi pela ajuda nas primeiras reações de biologia molecular. À Marta pelo aprendizado passado e pela paciência em me auxiliar sempre que precisei. Agradeço também à Maira e Michele pela ajuda e aos demais pós-graduandos e funcionários que convivi durante os períodos em que estive no Instituto Biológico.

Aos Professores Dr. Marcos Rogério André, Dr. José Maurício Barbanti Duarte e à Dra. Eveline dos Santos Zanetti, pela participação na banca de qualificação desta tese e pelas considerações feitas.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, por ter participado da banca de qualificação e de defesa desta tese, contribuindo assim, para a melhoria deste estudo. Agradeço também às Profas. Dras. Maria da Glória Buzinaro, Líria H. Okuda e Edviges Maristela Pituco por terem sido membros da banca de defesa e pelas inúmeras considerações feitas.

Aos servidores do Departamento de Patologia Veterinária: Francisca de Assis Ardisson, Edgar Homem e Narcizo Batista Tel, que me auxiliaram na execução de parte do projeto.

Agradeço a todos os funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, em especial aos funcionários Diego Mafra, Moysés Vicari e Branca José por serem sempre solícitos e gentis e por me ajudarem sempre que foi preciso.

E por fim, mas não menos importante, agradeço à minha família, aos meus pais Maria e Yoshiaki, que me educaram e nunca mediram esforços para que eu e minhas irmãs pudéssemos estudar. E mesmo depois de formada, me ajudaram e me

apoiaram para que eu continuasse estudando. Às minhas irmãs Tatiana, Stephanie e Amanda, à minha tia Kimiko e à minha avó Hama. Vocês são a minha base e sou grata a vocês pelo amor, amizade e apoio com o qual sempre pude contar ao longo desses anos todos. Obrigada Tatiana e Fernando por terem trazido ao mundo a pequena Isabela Harumi, minha sobrinha, que apesar de tão novinha já é capaz de nos ensinar tanto e de tornar nossas vidas mais felizes. Amo vocês.

E a todos os amigos feitos ao longo desses anos em Jaboticabal, em especial aos amigos de república Denise Chung, Peterson Pacheco, Dália Teixeira, Anaiane Souza, Fabrícia Filgueira, Livia Perles, Julia Ribeiro, Giulia Lemos, Vívian Tavares, Ricardo Uscategui, Cássia Maria, Andrea Bastos, Mariele de Santi, Caroline do Couto, Nathan Cruz, Juliana Oliveira, Fabiano Sá, Jorge Morales, Cristiane Melo, Ketherson Rodrigues, Artur Gouveia. Obrigada pela companhia, pelo apoio, pelos conselhos, pelos desabafos, pelos inúmeros almoços juntos e por sempre partilharmos os momentos de alegria e também os tristes. Os amigos são a família que escolhemos, e quando todos estávamos longe de casa, vocês foram minha família aqui em Jaboticabal. Obrigada por serem tão especiais, tenho muita sorte de tê-los em minha vida!

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	xiii
Autorização ICMBio.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Etiologia.....	24
2.2 Histórico.....	26
2.3 Epidemiologia.....	30
2.4 Vetores do VLA.....	32
2.5 Patogenia.....	33
2.6 Sinais Clínicos.....	35
2.7 Lesões macro e microscópicas.....	37
2.8 Diagnóstico.....	37
2.9 Diagnóstico diferencial.....	39
2.10 Tratamento, prevenção e controle.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Licença, área e animais de estudo.....	43
3.2 Colheita de sangue.....	45
3.3 Análises sorológicas.....	46
3.3.1 Imunodifusão dupla em gel de ágar.....	46
3.3.2 ELISA competitivo em fase sólida.....	46
3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR).....	49
3.5 Exame necroscópico, microscópico e colheita de tecidos.....	51
3.6 Colheita e identificação dos insetos.....	52
3.7 Análise estatística.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

5	CONCLUSÃO.....	67
6	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICES.....	81
	APÊNDICE A. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de bovinos do Setor de Digestibilidade (B1 a B60), Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (B61 a B96) e Setor de Gado de Leite (B97 a B132).....	82
	APÊNDICE B. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de ovinos do Hospital Veterinário (Ov1 a Ov27), Setor de Bioclimatologia (Ov28 a Ov46), Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos (Ov46 a Ov59), Setor de Ovinocultura (Ov60 a Ov96), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (Ov97 a Ov116) e propriedade particular (Ov117 a Ov174).....	86
	APÊNDICE C. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de caprinos do Setor de Caprinocultura (Cap1 a Cap42), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (Cap43 a Cap 45) e Hospital Veterinário (Cap46).....	91
	APÊNDICE D. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de cervídeos do NUPECCE.....	93
	APÊNDICE E. Números de insetos das famílias Ceratopogonidae, Psychodidae e Simuliidae colhidos nas diferentes épocas do ano de 2014 a 2016, em armadilhas luminosas montadas no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE, Jaboticabal - SP.....	97

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **"Estudo epidemiológico do vírus da língua azul em cervídeos brasileiros de cativeiro da região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil"**, protocolo nº 1723/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Karin Werther, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 16 de fevereiro de 2016.

Vigência do Projeto	22/02/2016 - 22/03/2016
Espécie / Linhagem	Cervídeos, bovídeos, caprinos e ovinos
Nº de animais	340
Peso / Idade	Variável
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	FCAV e particulares

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

AUTORIZAÇÃO ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52364-1	Data da Emissão: 23/02/2016 17:46	Data para Revalidação*: 24/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aline Kawanami	CPF: 326.770.618-13
Título do Projeto: Estudo epidemiológico do vírus da língua azul em cervídeos brasileiros de cativeiro da região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de insetos e material (sangue) dos animais	02/2016	06/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JABOTICABAL	SP	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Blastocerus, Ozotoceros bezoarticus, Mazama, Odocoileus
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Culicidae (*Qtde: 100)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue
3	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38682125





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52364-1	Data da Emissão: 23/02/2016 17:46	Data para Revalidação*: 24/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aline Kawanami	CPF: 326.770.618-13
Título do Projeto: Estudo epidemiológico do vírus da língua azul em cervídeos brasileiros de cativeiro da região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

4	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual
---	---	----------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38682125



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52364-1	Data da Emissão: 23/02/2016 17:46	Data para Revalidação*: 24/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aline Kawanami	CPF: 326.770.618-13
Título do Projeto: Estudo epidemiológico do vírus da língua azul em cervídeos brasileiros de cativeiro da região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38682125



Página 3/3

VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM CERVÍDEOS NEOTROPICAIS E BOVÍDEOS DOMÉSTICOS

RESUMO - Língua azul (LA) é uma doença viral infecciosa que afeta ruminantes domésticos e selvagens e é transmitida por mosquitos vetores do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). É de notificação obrigatória segundo lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Os sinais clínicos e lesões em casos agudos de infecção pelo vírus da língua azul (VLA) são sutis ou inexistentes; e quando presentes são muito semelhantes com outras enfermidades hemorrágicas, havendo a necessidade de técnicas laboratoriais complementares para o diagnóstico definitivo dessa enfermidade. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo epidemiológico da doença da língua azul nos cervídeos pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE e nos ruminantes domésticos mantidos nas proximidades, utilizando técnicas sorológicas (ELISA competitivo em fase sólida e imunodifusão dupla em gel de ágar - IDGA) e moleculares (RT-qPCR), além da investigação da população de insetos hematófagos existentes no local. Para pesquisa do VLA e seus anticorpos foi utilizado sangue total e soro dos cervídeos brasileiros provenientes do criatório e dos outros ruminantes domésticos mantidos nas proximidades do criatório. Dos cervídeos que vieram a óbito também foram colhidos fragmentos de órgãos para diagnóstico molecular. Pela técnica de IDGA apresentaram anticorpos anti-vírus da LA: 47,43% (37/78) dos cervídeos, 90,9% (120/132) dos bovinos, 55,49% (96/173) dos ovinos e 19,56% (9/46) dos caprinos. Pelo ELISA competitivo em fase sólida foram reagentes: 38,46% (30/78) dos cervídeos, 93,18% (123/132) dos bovinos, 60,69% (105/173) dos ovinos e 23,91% (11/46) dos caprinos. Pela técnica de RT-qPCR realizada a partir do concentrado de hemácias dos animais foram positivos: 10,14% (7/69) dos cervídeos, 0,75% (1/132) dos bovinos, 10,65% (18/169) dos ovinos e 9,09% (4/44) dos caprinos. Dos 46 cervídeos que vieram a óbito foi realizado também RT-qPCR de órgãos e 8,69% dos animais (4/46) foram positivos para VLA. Entre 2015 e 2016 foram capturados em armadilhas luminosas insetos hematófagos da família Ceratopogonidae, Psychodidae e Simuliidae, sendo negativos para vírus da LA por RT-qPCR. Quanto aos sorotipos circulantes na região, acometendo os animais, sua identificação ainda está sendo conduzida. Conclui-se que o VLA ocorre na região do município de Jaboticabal, uma vez que os animais estudados apresentaram alta soroprevalência e também foi possível detectar o VLA, tanto em ruminantes domésticos e selvagens saudáveis, quanto em cervídeos que vieram a óbito. Foi possível identificar a presença de mosquitos da família Ceratopogonidae, família a qual pertence o *Culicoides*, que é conhecidamente o vetor da LA.

Palavras-chave: diagnóstico, Diptera, doença hemorrágica, língua azul, ruminantes brasileiros

BLUETONGUE VIRUS IN NEOTROPICAL CERVIDS AND IN DOMESTIC BOVIDES

ABSTRACT - Bluetongue (BT) is an infectious viral disease that affects domestic and wild ruminants, transmitted by vectors, mosquitoes of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). The notification is mandatory according to the list of the OIE (World Organisation of Animal Health) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazilian Government. Clinical signs and lesions in acute cases of infection are often subtle or nonexistent; and when present are very similar with others hemorrhagic diseases, it is necessary to use complementary techniques for the definitive diagnosis of the disease. This study aimed to perform an epidemiological study of BT disease in captive cervids using serological (solid phase competitive ELISA and double agar gel immunodiffusion - AGID) and molecular techniques (RT-qPCR), in addition to the investigation of the population of hematophagous insects in the area. To investigate the Bluetongue virus (BTV) and their antibodies, whole blood and serum from Brazilian captive cervids and domestic ruminants located nearby were used. From cervids that died, fragments of organs were collected for molecular diagnosis. Using the AGID technique performed, the animals presented anti-BTV antibodies: 47.43% (37/78) of cervids, 90.9% (120/132) of cattle, 55.49% (96/173) of sheep and 19.56% (9/46) of goats. By the solid phase competitive ELISA were reagents: 38.46% (30/78) of cervids, 93.18% (123/132) of cattle, 60.69% (105/173) of sheep and 23.91% (11/46) of goats. Using RT-qPCR from the whole blood the positive results were: 10.14% (7/69) of cervids, 0.75% (1/132) of cattle, 10.65% (18/169) of sheep and 9.09% (4/44) of goats. From the 46 deer that died, RT-qPCR was also performed and 8.69% (4/46) animals were positive for BTV. Between 2015 and 2016, bloodsucking insects of the family Ceratopogonidae, Psychodidae and Simuliidae were trapped in luminous traps, being negative for BTV by RT-qPCR. The identification of circulating serotypes in the region that affects these animals is still being conducted. It is concluded that the VLA occurs in the region of Jaboticabal county, since the animals studied showed high seroprevalence and it was also possible to detect the VLA in healthy domestic and wild ruminants and in cervids that died. It was possible to identify the presence of mosquitoes of the Ceratopogonidae family, which belongs to *Culicoides*, which is known as the vector of BT.

Keywords: Bluetongue, Brazilian ruminants, diagnostic, Diptera, hemorrhagic disease

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécie animal e datas das colheitas de amostras realizadas nos diferentes locais amostrados na FCAV e na propriedade particular na cidade de Jaboticabal-SP.....	45
Tabela 2. Espécies de cervídeos necropsiados no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, segundo a idade e sexo dos animais, no período de 2011 a 2016.....	51
Tabela 3. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de cervídeos.....	55
Tabela 4. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de bovinos.....	56
Tabela 5. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de ovinos.....	56
Tabela 6. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de caprinos.....	57
Tabela 7. Dados de cervídeos pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) que foram positivos para vírus da LA pela RT-qPCR, realizadas nas amostras de órgãos colhidos durante as necropsias.....	60
Tabela 8. Número de insetos das famílias Ceratopogonidae, Psychodidae e Simuliidae colhidas no período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016 no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, Unesp, Jaboticabal.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do vírus da língua azul (Fonte: Schwartz-Cornil et al. 2008).....	24
Figura 2. Isolamento e identificação de Orbivírus em diferentes espécies de ruminantes na América do Sul. Fonte: Lobato et al. (2015).....	28
Figura 3. Distribuição geográfica da soroprevalência para vírus da língua azul (LA) em ruminantes domésticos da América do Sul (LOBATO et al., 2015).....	31
Figura 4. Vista aérea da FCAV e arredores onde eram mantidos os animais estudados. A: Setor de Caprinocultura, B: Setor de Ovinocultura, C: Setor de Digestibilidade (bovinos de corte), D: Setor de Gado de Leite, E: Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos (ovinos), F: Setor de Bioclimatologia (ovinos), G: Hospital Veterinário (ovinos), H: CPPAR (Centro de Pesquisa em Sanidade Animal) (bovinos), J: propriedade particular (ovinos), N: NUPECCE e L: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (ovinos). Os valores dentro dos retângulos indicam as distâncias dos respectivos locais até o NUPECCE.....	44
Figura 5. Configuração da placa para ELISA CFS após aplicação das amostras de soros e suas respectivas diluições para detecção de anticorpos contra vírus da LA.....	48
Figura 6: Armadilha luminosa de luz negra convencional durante fim da tarde, quando era ligada.....	52
Figura 7: Armadilha luminosa de luz negra convencional ligada durante a noite.....	52
Figura 8. Interpretação do exame de imunodifusão dupla em gel de ágar. A: amostras ST reagentes para o vírus da LA, sendo as amostras 1, 3 e 5 os soros controles positivos. B: amostras ST não reagentes para o vírus da LA, sendo as amostras 1, 3 e 5 os soros controles positivos.....	55
Figura 9. Aspecto macroscópico de órgãos de <i>Mazama gouazoubira</i> necropsiado. Animal positivo para LA na RT-qPCR A: Pulmão com coloração avermelhada em toda extensão. B: Coração com áreas hemorrágicas em epicárdio.....	61
Figura 10. Fotomicrografia de órgãos de Veado-catingueiro (<i>M. gouazoubira</i>) acometido por língua azul. A: linfonodo submandibular apresentando moderada hemorragia multifocal. B: tonsila com moderada hemorragia multifocal (4x, Coloração HE).....	61

Figura 11 A e B. Mosquitos da família Ceratopogonidae.....	62
Figura 12 A e B. Mosquitos da família Psychodidae.....	63
Figura 13 A e B. Mosquitos da família Simuliidae.....	63
Figura 14. Gráfico com as médias de chuvas e temperaturas de dezembro de 2014 a janeiro de 2016. (Fonte: Estação Agroclimatológica, Unesp - Jaboticabal).....	65

1 INTRODUÇÃO

No Brasil existem oito espécies de cervídeos conhecidas: *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-Pantanal), *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro), *Mazama americana* (veado-mateiro), *Mazama bororo* (veado-mateiro pequeno), *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), *Mazama nana* (veado-bororó) e *Mazama nemorivaga* (veado-roxo) (DUARTE, 2007). Segundo a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*), três espécies se encontram na categoria vulnerável: cervo-do-Pantanal, veado-mateiro-pequeno e veado-bororó (IUCN 2016).

As doenças podem ter inúmeras implicações econômicas, no manejo e na saúde de populações de ruminantes, sejam eles domésticos ou selvagens. Algumas doenças podem causar a morte de animais, levando a perdas importantes na densidade populacional. O conhecimento do impacto de doenças sobre as populações de ruminantes, bem como sua ocorrência são dados importantes e necessários.

A língua azul (LA) é uma doença infecciosa causada por um Orbivírus e transmitida pelo mosquito hematófago do gênero *Culicoides*, que acomete tanto ruminantes domésticos, quanto selvagens. Devido sua importância econômica é de notificação obrigatória segundo a lista de doenças da Organização Mundial da Saúde Animal e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

A LA é frequentemente classificada como uma doença de consequências econômicas severas, pois gera restrição de movimentação, de exportação e importação de animais e de sêmen, diminuição de produtividade, além do prejuízo pela morte de animais.

Os sinais clínicos e achados de necropsia em animais infectados pelo vírus da língua azul (VLA), frequentemente são, em casos agudos, sutis ou inexistentes, e quando presentes as alterações são muito semelhantes com as de outras enfermidades hemorrágicas, tais como: doença epizootica hemorrágica (DEH) e doença hemorrágica por adenovírus (DHA). Portanto, para elucidar o diagnóstico, técnicas laboratoriais complementares são necessárias, entre elas o isolamento

viral, detecção do material genômico viral em amostras biológicas ou a detecção de anticorpos específicos no soro (ARADAIB et al., 1994).

A densidade do vetor e do hospedeiro, bem como fatores ambientais, estão relacionados com a distribuição do VLA, que é considerado endêmico em ruminantes selvagens em grande parte da África e da América do Norte (GERDES, 2004; STALLKNECHT; HOWERT, 2004).

Baseado em evidências sorológicas, sabe-se que o vírus da LA circula pela América do Sul. O vírus foi identificado por RT-qPCR e por isolamento viral somente no Brasil, na Argentina e também na Guiana Francesa e apesar da importância da LA, ainda pouco se sabe sobre a distribuição dos sorotipos de VLA. Informações sobre as características biológicas do vetor do gênero *Culicoides* e a competência das espécies descritas na América do Sul também são escassas (LOBATO et al., 2015).

No início da década de 90 foram descritos no Brasil os primeiros relatos de cervídeos apresentando sinais clínicos e lesões sugestivas de doenças hemorrágicas, que se apresentavam de forma sazonal, em estações úmidas e quentes, atingindo cerca de 40% do rebanho e levando à morte de animais (ARITA et al., 1997), porém sem diagnóstico de agente etiológico envolvido (DUARTE; ARITA, 1992; MORATO et al., 1993; ARITA et al., 1997).

Duarte e Arita (1992) descreveram a ocorrência de doença hemorrágica em veados catigueiros (*Mazama gouazoubira*) do criadouro científico do NUPECCE acometidos de forma sazonal (entre janeiro, fevereiro e março), nos quais eram observadas: anorexia, edema submandibular e de face, laminite, e os animais que sobreviviam apresentavam deformidades em cascos e regiões cicatriciais em língua (decorrente de necrose). DUARTE (2007) refere que os surtos de enfermidades hemorrágicas ocorridos nos cervídeos do NUPECCE acometidos durante vários anos chegaram a gerar perda anuais de cerca de 50% do plantel. Levantamento sorológico utilizando a técnica de ELISA competitivo, realizado em 1998–1999 nos cervídeos desse plantel, comprovou a presença de anticorpos contra o VLA e o vírus da DEH (PANDOLFI, 1999).

Desde 1994 têm sido realizadas necropsias no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp dos cervídeos pertencentes ao NUPECCE.

Frequentemente os animais apresentam lesões macro e microscópicas sugestivas de doenças hemorrágicas virais. Foi diagnosticado nesses veados o VLA em 2012 a partir de amostras fixadas em formol utilizando RT-qPCR, e em 2014 usando a mesma técnica em amostras de sangue e tecidos congelados.

Os objetivos do presente estudo foram: i) determinar a ocorrência de anticorpos contra o vírus da LA em cervídeos do criatório do NUPECCE, da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, e em bovinos, ovinos e caprinos de locais próximos ao criatório, utilizando os testes de IDGA e ELISA CFS; ii) correlacionar os resultados obtidos pelos métodos de IDGA e ELISA CFS; iii) fazer a detecção do vírus da LA em amostras de sangue e tecidos dos cervídeos do criatório e dos ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos) por meio da RT-qPCR; iv) identificar morfolologicamente os insetos hematófagos capturados e verificar a presença de material genético do vírus da LA nos mesmos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

A família Reoviridae é composta por vírus com genoma RNA fita dupla segmentado, que infectam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo invertebrados, plantas e vertebrados. Dentre os 11 gêneros desta família apenas *Orbivirus* e *Rotavirus* ocasionam infecções que, por suas características epidemiológicas e pela gravidade dos sinais clínicos e lesões, são considerados importantes em mamíferos (ALFIERI et al., 2007).

Há 19 espécies de *Orbivirus*, abrangendo pelo menos 130 sorotipos. A maioria desses vírus é transmitida por vetores, sendo a língua azul (LA) e a doença epizootica hemorrágica (DEH) as enfermidades que apresentam maior importância nas populações de mamíferos selvagens (HOWERTH et al., 2001).

Os vírus pertencentes ao gênero *Orbivirus* possuem formato icosaédrico, medem entre 60 a 85nm de diâmetro e não apresentam envelope lipídico (Figura 1). São, portanto, resistentes a solventes lipídicos, sensíveis aos desinfetantes à base de iodóforos e fenóis. São estáveis em pH entre 6,5 e 8,0 e à temperatura de 4°C, principalmente em matéria orgânica (ALFIERI, 2007).

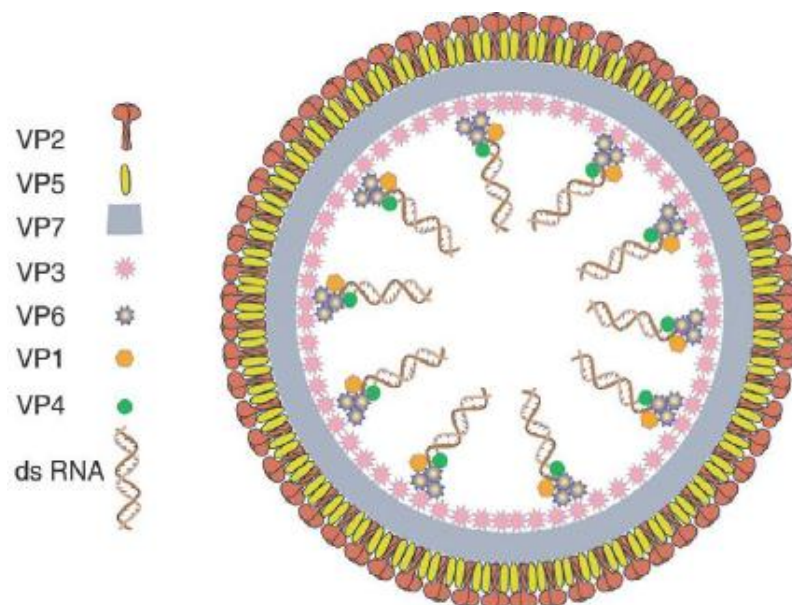


Figura 1. Esquema do vírus da língua azul (Fonte: Schwartz-Cornil et al. 2008).

O genoma do vírus da LA é composto por 10 segmentos lineares de RNA de fita dupla, com capsídeo viral externo contendo as proteínas VP2 e VP5 e uma camada interna ou núcleo, contendo as proteínas VP3, VP7 e as proteínas VP1, VP4 e VP6. Cinco proteínas não estruturais (NS1, NS2, NS3, NS3A e NS4) são produzidas em células infectadas pelo vírus da LA (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

A proteína VP2 é responsável pela ligação ao receptor da célula alvo do organismo hospedeiro, pela hemaglutinação e por desencadear a produção de anticorpos neutralizantes específicos ao sorotipo. Os resultados de estudo realizados por Hassan e Roy (1999) demonstraram que a proteína VP2 é responsável pela entrada do vírus nas células de mamíferos. A VP2 purificada também teve uma forte afinidade para a ligação com a glicoforina A, uma sialoglicoproteína componente de eritrócitos, o que indica que a proteína VP2 pode atuar na transmissão do VLA pelo vetor *Culicoides* para vertebrados hospedeiros (HASSAN; ROY, 1999).

A VP5 purificada demonstrou formar prontamente trímeros em solução, uma característica de muitas proteínas envolvidas na penetração da membrana celular, demonstrando a função da VP5 na penetração de células do vírus e subsequente entrada para ligação à célula e a endocitose (HASSAN et al., 2001).

A VP7 é a proteína mais abundante que compõe o núcleo e também os principais determinantes antigênicos específicos de grupo. Apesar de fazer parte do núcleo, sabe-se que esta proteína está exposta em algumas regiões da superfície viral e é capaz de estimular a produção de anticorpos (ALFIERI, 2007). A VP3 juntamente com a VP7 tem um papel importante na integridade do núcleo viral. Essas proteínas virais expressam determinantes antigênicos específicos de grupo que definem vários grupos filogenéticos distintos (ANTHONY et al., 2007).

As proteínas VP1, VP4 e VP6 estão envolvidas na transcrição e na replicação do vírus, são chamadas respectivamente RNA polimerase RNA-dependente (VP1), enzima seladora de RNA (VP4) e segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) helicase (VP6) (NASSON et al., 2004).

As proteínas não estruturais NS1 e NS2 são as mais expressas em células infectadas, enquanto as proteínas NS3 e NS3A quase não são detectadas em

células de mamíferos. No entanto, a NS3 e NS3A são sintetizadas em grande quantidade em células de inseto, sugerindo que tenham um papel importante na replicação e disseminação de VLA no vetor (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008). Já a NS4 desempenha um papel importante na interação vírus-hospedeiro e é um dos mecanismos de partida para neutralizar a resposta antiviral do hospedeiro (RATINIER et al., 2011).

Existem 27 sorotipos de VLA descritos (ZIENTARA et al., 2014), com uma extensa heterogeneidade genética das cepas, independentemente do sorotipo, que surgem através da deriva e mutação genética (MACLACHLAN; MAYO, 2013). O último sorotipo descrito, sorotipo 27 foi sequenciado a partir do vírus detectado em caprinos clinicamente saudáveis durante um programa de vacinação e monitoramento de LA em Córsega, França (JENCKEL et al., 2015).

2.2 Histórico

A LA já era conhecida pelos criadores de animais na África do Sul durante o início do século XIX, sendo inicialmente chamada de “febre catarral das ovelhas” ou “febre catarral malárica”. No entanto, as primeiras descrições científicas detalhadas da doença em ovinos foram relatadas por HUTCHEON (1902) e SPREULL (1902, 1905). É uma doença historicamente africana, e embora não tenha sido relatada em todos os países da África, provavelmente seja enzoótica em todo o continente (ERASMUS; POTGIETER, 2009). Surtos foram descritos em ovelhas em Chipre durante o início do século 20, sendo a LA considerada uma doença africana até que foram reconhecidos casos nos Estados Unidos no final dos anos 40 (MACLACHLAN, 2015).

Nos Estados Unidos, a LA foi identificada pela primeira vez em ovinos durante surtos ocorridos entre 1948 a 1952 (HARDY; PRICE, 1952) e nos 30 anos subsequentes, os sorotipos 2, 10, 11, 13 e 17 foram isolados de bovídeos domésticos e selvagens e considerados endêmicos no país. No entanto desde 1999, novos sorotipos não endêmicos foram então identificados nos Estados Unidos: os sorotipos 1, 3, 5, 6, 9, 8, 12, 14, 18, 19, 22 e 24 (OSTLUND, 2015).

Na América Central e Caribe, e mesmo nas Antilhas Menores, o vírus da LA encontra-se disseminado e possivelmente esta região seja uma fonte de LA para o resto do continente, sem barreiras ecológicas nem geográficas descritas para isolar geograficamente a América Central da América do Norte ou do Sul (LEGISA et al., 2014). Em estudo realizado por Mo et al. (1994), foram identificados os sorotipos 1, 3, 4 e 6, em amostras de bovinos e ovinos da América Central.

Existem 27 sorotipos de VLA descritos (ZIENTARA et al., 2014) e apesar do vírus parecer ser endêmico em várias regiões da América do Sul, informações sobre quais são os sorotipos circulantes ainda são muito limitadas. Os sorotipos de vírus da LA foram identificados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real e isolamento do vírus no Brasil, Argentina e na Guiana Francesa (LOBATO et al., 2015).

O primeiro relato de isolamento de VLA de animais oriundos do Brasil ocorreu em gado zebu exportado para os Estados Unidos, dos quais foi isolado o sorotipo 4 (GROOCKOCK; CAMPBELL, 1982). Cerca de 20 anos depois, foi descrito o isolamento do sorotipo 12 do VLA de um surto no estado do Paraná acometendo ovinos (CLAVIJO et al., 2002) e isolamento do sorotipo 4 de um surto que ocorreu no Rio de Janeiro (BALARO et al., 2014). Novos sorotipos de VLA foram isolados e identificados de surtos que acometeram veados-bororós em uma reserva ecológica em Foz do Iguaçu, Paraná. Os sorotipos de VLA identificados foram os sorotipos 3, 14, 18, 19 e 22 (OIE 2016). Em estudo realizado por Matos et al. (2016), do isolado de VLA de ovinos que apresentaram sinais clínicos da doença, no sequenciamento completo do genoma foi identificado o sorotipo 17.

Estudo realizado por Pandolfi (1999) em cervídeos de cativeiro do NUPECCE, da Unesp de Jaboticabal, descreveu 9% do plantel de 22 animais sorologicamente positivos para DEH. Nesses mesmos animais foi realizado estudo sorológico com ELISA competitivo para VLA comprovando a presença de anticorpos em 23% dos 22 cervídeos analisados (PANDOLFI, 1999). Estudos sorológicos realizados em 107 cervos-do-Pantanal de vida livre em Promissão – SP (MONTASSIER et al., 2001) revelaram prevalência elevada de 71% de animais com anticorpos anti-vírus da DEH.

Embora a doença clínica não tenha sido relatada na Argentina, o VLA foi detectado e isolado de rebanhos sentinelas. Este primeiro isolamento de VLA na Argentina foi identificado como sorotipo 4 (LAGER et al., 2004).

Na Guiana Francesa foram identificados oito sorotipos de VLA, sorotipos 1, 2, 6, 10, 12, 13, 17 e 24, isoladas a partir de amostras colhidas de bovinos, búfalos e ovinos, tanto de animais saudáveis quanto de animais que apresentavam sinais clínicos sugestivos de LA. Esse mesmo estudo demonstrou uma alta soroprevalência nos animais para o VLA e para o vírus da DEH (VIAROUGE et al., 2014).

A Figura 2 resume a identificação de orbivírus na América do Sul em diferentes espécies de ruminantes a partir de animais sintomáticos e assintomáticos.

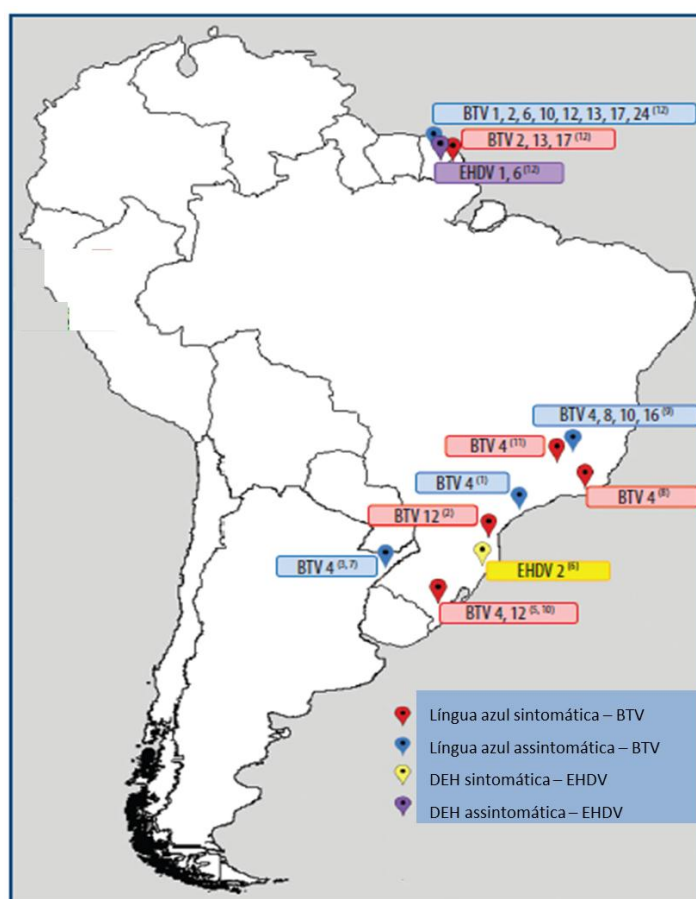


Figura 2. Isolamento e identificação de Orbivírus em diferentes espécies de ruminantes na América do Sul. Fonte: Lobato et al. (2015).

¹ Grocock; Campbell, 1982, ² Clavijo et al., 2002, ³ Gorsch et al., 2002, ⁵ Antoniassi et al., 2010, ⁶ Favero et al., 2013, ⁷ Legisa et al., 2013, ⁸ Balaro et al., 2014, ⁹ Gasparini et al., unpublished data, ¹⁰ Guimarães et al. unpublished data, ¹¹ Rosa et al. unpublished data, ¹² Viarouge et al. 2014.

As mudanças recentes na distribuição global de vírus da LA foram especialmente profundas na Europa, onde, antes de 1999, apenas a incursão transitória e limitada de sorotipos isolados em porções mediterrânicas do continente havia sido documentada. Desde então, vários sorotipos de vírus da LA invadiram e se espalharam pela borda norte da Bacia do Mediterrâneo e o vírus está agora bem estabelecido em partes da região, como, por exemplo, na maior parte do centro/sul da Itália (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

Independente da ocorrência de múltiplos sorotipos de VLA na Europa Mediterrânea, uma cepa especialmente virulenta de VLA, o sorotipo 8, apareceu e rapidamente se espalhou por grande parte do norte da Europa. Este vírus se espalhou até as Ilhas Britânicas e Escandinávia e, embora tenha se espalhado rapidamente por toda a Europa, parece ter estabelecido infecção enzoótica significativa apenas em regiões meridionais muito limitadas do continente. O aparecimento do sorotipo 8 no norte da Europa ocorreu após um verão incomum muito quente, e o vírus foi detectado em espécies de *Culicoides* que não eram previamente considerados como vetores da doença (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

Embora a LA tenha estado presente na América do Norte há mais de 60 anos, a situação na Europa é um alerta do potencial que os sorotipos de vírus da LA têm de se expandir além das fronteiras tradicionais e, possivelmente, de infectar novos vetores e causar maior morbidade ao entrar em populações de animais suscetíveis (RUDER et al., 2015).

Na Austrália, o sorotipo 20 do VLA foi detectado pela primeira vez em um “pool” de espécies de *Culicoides* coletados no Território do Norte em 1975 (ST GEORGE et al., 1978). O sorotipo 1 foi posteriormente isolado pela primeira vez em 1979 a partir de sangue de bovinos colhido também no Território do Norte (ST GEORGE et al., 1980). Desde então, outros sorotipos de vírus da LA foram isolados: sorotipos 3, 5, 7-13, 15, 16, 21 e 23 em diferentes regiões da Austrália. Apesar da presença de diferentes sorotipos, a ocorrência da doença não foi registrada (BOYLE et al., 2014). Uma vez que ruminantes vivos não são importados para Austrália, a vacinação contra LA não é permitida e o continente é separado da Ásia por água, há evidências de que o movimento de vírus da LA na Austrália ocorra por meio da

dispersão pelo vento de *Culicoides* infectados (EAGLES et al., 2012, EAGLES et al., 2013).

Na Ásia foram descritos sorotipos de VLA, sendo 12 na China (sorotipos 1, 2, 3, 4, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 21 e 23), dez sorotipos na Índia (1, 2, 3, 4, 8, 9, 16, 17, 18 e 23), oito sorotipos na Indonésia (1, 3, 7, 9, 12, 16, 21 e 23), seis sorotipos na Malásia (1, 2, 3, 9, 16 e 23) e dois sorotipos em Taiwan (2 e 12) (TING et al., 2005; DANIELS; LUNT; PRITCHARD, 2009; LEE et al., 2010).

2.3 Epidemiologia

O VLA infecta uma grande variedade de ruminantes domésticos e selvagens, no entanto a doença clínica é mais observada em algumas raças de ovinos e em algumas espécies de cervídeos (TAYLOR, 1986; MACLACHLAN, 1994). Os bovinos são considerados importantes epidemiologicamente, pois atuam como reservatórios do vírus por longos períodos e geralmente apresentam infecções subclínicas (MACLACHLAN, 1994).

A incidência e a distribuição da doença estão relacionadas com o ambiente e com fatores climáticos que afetam a sobrevivência e a distribuição dos vetores, mosquitos *Culicoides* (KUSILUKA; KAMBARAGE, 1996).

As condições de temperatura e umidade de grande parte do Brasil favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores, o que pode tornar a doença endêmica e com alta prevalência (LOBATO, 1996).

Levantamentos sorológicos realizados em bovinos, ovinos e caprinos em diferentes estados do Brasil (LOBATO et al., 2015) demonstraram que as regiões Sudeste, Centro-oeste e Norte apresentam grande número de animais soropositivos, enquanto nas regiões Sul e Nordeste os índices de soroprevalência são mais baixos (Figura 3).

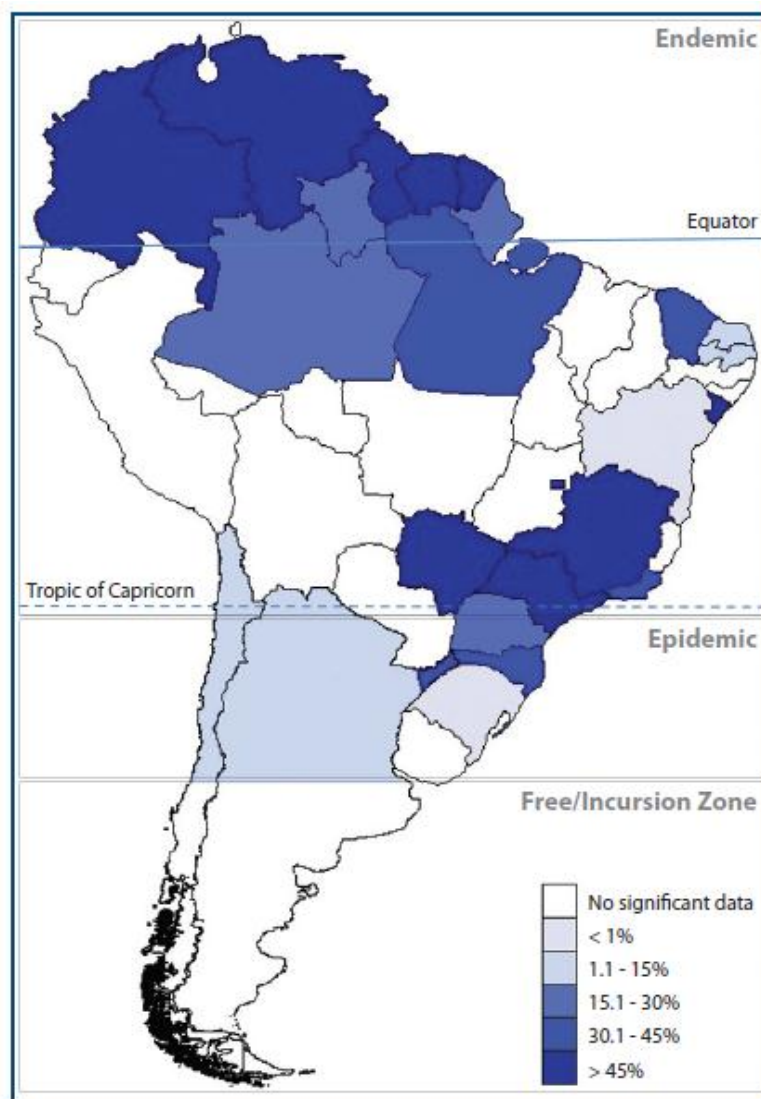


Figura 3. Distribuição geográfica da soroprevalência para vírus da língua azul (LA) em ruminantes domésticos da América do Sul (LOBATO et al., 2015).

2.4 Vetores do VLA

Em meados do século XX, Du Toit (1944) demonstrou a transmissão da LA por meio da picada dos mosquitos do gênero *Culicoides*. Múltiplos sorotipos têm sido identificados nestes insetos, indicando que vírus distintos podem estar presentes em um único vetor (ALFIERI et al., 2007). Acredita-se que a variação geográfica na distribuição das doenças hemorrágicas ocorra devido à interação de vários fatores, incluindo abundância e distribuição de mosquitos *Culicoides*, sorotipo e patogenicidade dos vírus da LA, imunidade dos animais e variações genéticas dos

vírus de LA em cervídeos susceptíveis (STALLKNECHT; HOWERTH; GAYDOS, 2002).

Os *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) são moscas pequenas, com 1 a 3 mm de comprimento. O ciclo de vida consiste em ovo, quatro estádios larvais, pupas e estádios adultos. As fases imaturas requerem umidade e matéria orgânica para se desenvolverem e locais de reprodução incluem solos úmidos ou saturados, pântanos, buracos de árvores, esterco de animais e frutas podres ou outra vegetação (MEISWINKEL; NEVILL; VENTER, 1994).

No Brasil, os mosquitos do gênero *Culicoides* são popularmente chamados de “maruim”, “borrachudo”, “mosquito pólvora” ou “mosquito do mangue” e se alimentam de sangue durante o período crepuscular e durante a noite (CHAGAS; PINHEIRO, 2004). As condições de temperatura e umidade na maior parte do país favorecem a multiplicação e a manutenção desses vetores (CLAVIJO et al., 2002).

Quando um *Culicoides* competente ingere sangue contaminado com o vírus da LA, o vírus liga-se à superfície luminal das células do intestino médio, infecta estas células e sofre replicação, sendo então liberado para a hemocele de onde infecta os órgãos-alvo secundários, incluindo as glândulas salivares. O ciclo inteiro da infecção à transmissão pode levar cerca de 10 a 15 dias a 25°C e os vetores, uma vez infectados geralmente permanecem assim a vida toda (MELLOR, 1990).

Das mais de 1000 espécies de *Culicoides* que ocorrem no mundo todo, somente cerca de 30 espécies são consideradas vetores do VLA (MACLACHLAN; MAYO, 2013). Por exemplo, *Culicoides imicola* é o principal vetor de vários sorotipos de LA em porções extensas da África e da Ásia, enquanto *Culicoides sonorensis* é o principal vetor, talvez exclusivo, dos sorotipos 10, 11, 13 e 17 em grande parte da América do Norte (GIBBS; GREINER, 1994; TABACHNICK, 2004, 2010).

Existem muitas lacunas relacionadas à informação sobre os vetores de orbivírus na América do Sul. Há indícios de que o transmissor de LA na América do Sul seja o *Culicoides insignis* (TABACHNICK, 2004), embora nem o vírus da LA nem da DEH tenha sido isolado de qualquer vetor neste continente. Outras espécies comumente descritas em diferentes países do continente são *Culicoides foxi*, *Culicoides paraensis*, *Culicoides venezuelensis*, *Culicoides lahillei*, *Culicoides*

leopoldoi e *Culicoides limai*. No entanto, o papel dessas espécies na transmissão dos orbivírus ainda não é conhecido (LOBATO et al., 2015).

Uma vez que vírus da LA foi isolado de *Culicoides pulsillus* na América Central e Caribe, e essa espécie está também presente na América do Sul, é possível que *C. pulsillus* possa ser também um vetor nessas áreas (MO et al., 1994, RONDEROS; GRECO; SPINELLI, 2003). As informações disponíveis na América do Sul são insuficientes para excluir a possibilidade de que outras espécies de *Culicoides* também possam transmitir a LA (LAGER, 2004).

Outras formas de transmissão também são possíveis, porém só foram descritas experimentalmente, como transmissão por carrapatos (STOTT; OSBURN; ALEXANDER, 1985; BOUWKNEGT et al., 2010), transmissão por *Melophagus ovinus*, um ectoparasito de ovinos (LUEDKE; JOCHIM; BOWNE, 1965), transmissão por mordida ou ferida em cervídeos (LÓPEZ-OLVERA et al., 2010), transmissão por sêmen em monta natural ou inseminação artificial em bovinos (BOWEN; HOWARD, 1984) e transmissão transplacentária em bovinos (DE CLERCQ et al., 2008).

2.5 Patogenia

A infecção pelo vírus da LA ocorre após a picada de mosquitos *Culicoides* infectados. A replicação inicial do vírus ocorre no sítio da picada do inseto vetor, sobretudo nas células endoteliais e em células do sistema linforreticular. A replicação primária é seguida por viremia associada às células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e disseminação do vírus pelos linfonodos, baço, medula óssea e outros tecidos, nos quais o vírus se replica no sistema microvascular, resultando em petéquias, alteração patológica característica da doença (ALFIERI et al., 2007, KITCHING, 2008). Pode ocorrer também hemorragia, exsudação, edema, estase e oclusão de vasos sanguíneos que causam hipóxia e consequentemente levam a lesões necróticas (KUSILUKA; KAMBARAGE, 1996).

O vírus da LA se liga a glicoforinas na superfície dos eritrócitos de bovinos e ovinos, onde persiste em invaginações da membrana. Nesses locais, o vírus

permanece protegido dos anticorpos circulantes por longos períodos, resultando em viremia prolongada (ALFIERI et al., 2007).

As células endoteliais na microvascularização são as células alvo primárias para a replicação do vírus da LA, tanto em espécies de ruminantes que desenvolvem infecção clínica, quanto assintomática. Fatores que contribuem para a interação entre o vírus da LA e as células endoteliais em ovinos e bovinos não estão totalmente compreendidos, mas provavelmente são importantes para a compreensão das diferenças na patogênese entre as diferentes espécies (RUSSEL et al., 1996).

As células endoteliais ovinas e bovinas produzem um mediador solúvel da atividade do interferon em resposta à infecção por LA. Estudo *in vitro* demonstrou que as células endoteliais ovinas produziram níveis mais elevados de atividade de interferon em níveis mais baixos de infecção quando comparados à infecção de células endoteliais de bovinos. Estes achados indicam diferenças na interação vírus da LA e células endoteliais que podem contribuir para a patogênese da doença inflamatória grave que é característica da doença clínica da LA em ovinos (RUSSEL et al., 1996).

Após a infecção por orbivírus, os animais desenvolvem resposta imune humoral e celular. Os anticorpos anti-virais neutralizantes (tipo específico) e não neutralizantes (grupo específico) se desenvolvem de 7 a 14 dias após infecção. No entanto, o VLA pode coexistir com altos títulos de anticorpos por períodos de tempo variáveis (STOTT, 1999).

O período de incubação da LA em ruminantes silvestres varia de 10 a 20 dias e os surtos são mais comuns nas estações quentes e úmidas, decorrentes do aparecimento dos *Culicoides* e, conseqüentemente, da maior transmissão do vírus (HAIGH et al., 2002). A população desses insetos tende a diminuir no outono e inverno, quando a temperatura é mais baixa (ALFIERI et al., 2007).

O vírus pode atravessar a barreira placentária e infectar o feto e levar à morte do mesmo, devido à necrose hepática e supressão do sistema hematopoiético do feto (KUSILUKA; KAMBARAGE, 1996).

2.6 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da LA podem variar de acordo com a espécie afetada, sorotipo do vírus envolvido e estado imune do animal (THORNE, 1982). As espécies mais afetadas são os ovinos e cervídeos, podendo ocorrer morte em menos de 24 horas após aparecimento repentino de febre alta e sinais de dificuldade respiratória. Pode haver descarga nasal hemorrágica e hiperemia em mucosa nasal e oral, edema na cabeça e pescoço, diarreia, disenteria e laminite, geralmente há aumento de salivação e espuma na cavidade oral (OSBURN, 2007).

Nos ruminantes em geral podem ocorrer lesões podais que são caracterizadas por hiperemia da banda coronária, pés quentes e doloridos, relutância em mover-se ou claudicação severa que se manifesta por andar sobre os joelhos. Pode se formar uma faixa vermelha escuro para roxo na pele acima da coroa dos cascos. Os sinais clínicos são menos graves em áreas endêmicas (KUSILUKA; KAMBARAGE, 1996).

Em ovinos e cervídeos, a língua pode estar edemaciada e estendida para fora da boca, mas raramente se torna cianótica, apesar deste sinal ter sido o responsável pela denominação da doença. Ulcerações na língua e em mucosas podem ocorrer e propiciar infecções secundárias e necrose, principalmente na região superior do esôfago e faringe, causando vômito e aspiração do conteúdo ruminal, levando à pneumonia (ALFIERI et al., 2007).

Em ovinos acometidos pela LA, em um surto no estado do Rio Grande do Sul, o curso clínico, dos animais que morreram, variou em média de dois a quatro dias, e nos ovinos que se recuperaram, o curso clínico da LA apresentou uma média de 15 dias. Tanto os ovinos que vieram a óbito quanto os que se recuperaram apresentaram os mesmos sinais clínicos (hipertemia, apatia, prostração, disfagia, dispneia, secreção nasal mucosa, úlcera em cavidade oral, emaciação), porém com intensidades diferentes (ANTONIASSI et al., 2010).

Em bovinos os surtos de LA são esporádicos, a morbidade é variável (geralmente em torno de 5%), a mortalidade muito baixa ou nula e os animais geralmente apresentam uma viremia prolongada, podendo chegar a períodos de mais de 100 dias (GIBBS; GREINER, 1994). Em bovinos a infecção pelo vírus da

língua azul é subclínica na maioria das vezes. Quando apresenta sinais clínicos, estes se caracterizam por febre, salivação, edema dos lábios, corrimento nasal com lesões ulcerativas da língua e cavidade oral, em alguns casos (RIET-CORREA et al., 1996), diarreia crônica, abortamento e crescimento excessivo dos cascos (GIBBS; GREINER, 1994). Se a infecção ocorre em vacas prenhes podem ocorrer abortos ou malformações congênitas, caracterizadas por hidrocefalia, microcefalia, artrogripose, cegueira e deformações da mandíbula (RIET-CORREA et al., 1996).

A susceptibilidade à infecção pelo vírus da LA em caprinos, apesar de variável, é menor do que o observado em ovinos. Em alguns animais infectados experimentalmente foi observada somente discreta hiperemia das mucosas conjuntival e nasal (ERASMUS, 1975).

As principais consequências da infecção pela LA, tanto para bovinos quanto para ovinos, são as perdas indiretas devido ao aborto, à queda do desempenho reprodutivo, à perda de condição corporal e à queda na produção de leite (para bovinos) ou convalescença prolongada (para ovinos) (LOBATO, 1999).

2.7 Lesões macro e microscópicas

Os achados macroscópicos em ruminantes selvagens acometidos pela LA e/ou DEH variam de acordo com a severidade das doenças, sendo que não podem ser diferenciadas pelas lesões encontradas na necropsia, nem pelos exames histopatológicos. Na forma superaguda, pode haver edema grave na cabeça, pescoço, língua e pulmões. Na forma aguda, o edema pode estar acompanhado por hemorragia em diversos órgãos, como coração e trato gastrointestinal. Pode haver áreas de necrose e ulceração em língua, coxim dentário, palato duro, rúmen e abomaso (HOFF; TRAINER, 1981).

As lesões observadas são decorrentes dos danos causados pelos vírus nos capilares sanguíneos, que resultam em aumento da permeabilidade vascular, edema, hemorragia, trombose, isquemia e necrose das mais variadas estruturas e órgãos (PARSONSON, 1990; JUBB et al., 1993, ALFIERI et al., 2007).

No exame *post mortem* de ovinos acometidos pela LA podem ser observadas lesões em pele e mucosas, edema generalizado, hiperemia, hemorragia e necrose

de músculos esquelético e cardíaco, além de degeneração hialina em musculatura (KUSILUKA; KAMBARAGE, 1996). Os linfonodos geralmente encontram-se infartados, traqueia e brônquios com presença de espuma e conteúdo alimentar e coração e base da artéria pulmonar com petéquias e/ou hemorragia (ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014).

As lesões causadas pelo vírus da LA em bovinos foram particularmente bem descritas entre os animais afetados durante a epizootia causada pelo sorotipo 8 na Europa. As alterações mais notáveis nos rebanhos bovinos afetados pelo sorotipo 8 foram: crostas e lesões em mucosa nasal, erosões dos lábios/crostas nas narinas ou ao redor das narinas, erosões da mucosa oral, salivação, febre, conjuntivite, coronite, necrose muscular e rigidez dos membros (ELBERS et al., 2008).

No exame histológico são observadas vasculite disseminada e trombose associada a hemorragias, alterações degenerativas e necrose são encontradas em diversos órgãos (HOWERTH et al., 2001). Observa-se infiltrado celular inflamatório, vacuolização celular, estase sanguínea, hipertrofia das células endoteliais de vasos pouco calibrosos e ruptura dos mesmos (MICHELSEN, 1990).

As principais alterações histológicas em ovinos acometidos por LA ocorreram no tecido muscular cardíaco e esquelético, especialmente em esôfago e consistiam em lesões bifásicas caracterizadas por degeneração/necrose hialina e flocular de miofibras associadas com micro-calcificação e infiltrado inflamatório mononuclear. Pneumonia aspirativa associada à presença de material vegetal e bactérias na luz dos brônquios também foi observada (ANTONIASSI et al., 2010).

Outras alterações histológicas observadas em ovinos infectados por LA foram edema pulmonar severo e difuso, hemorragia multifocal em miocárdio e músculos papilares cardíacos, vasculite e hemorragia intramural multifocal na artéria pulmonar, discreta estomatite ulcerativa focal, discreta rumenite e reticulite não purulenta, nefrose e pododermatite ulcerativa purulenta (BALARO et al., 2014).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da LA é realizado pelo isolamento viral, detecção de anticorpos específicos no soro do animal ou ainda detecção do RNA viral em amostras

biológicas (ARADAIB et al., 1994). A técnica de RT-qPCR fornece resultado muito mais rápido do que o isolamento viral e possui a vantagem de poder ser realizado em tecidos não mais adequados para o isolamento (HOWERTH et al., 2001). A utilização de imunohistoquímica para o diagnóstico de LA foi descrito por Sánchez-Cordón et al. (2010), no qual a proteína não estrutural VP7 pôde ser detectada em tecidos de bovinos e ovinos, sabidamente positivos para LA, fixados em Bouin ou formaldeído e embebidos em parafina.

De acordo com o Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), os testes recomendados para diagnóstico de LA e seus objetivos encontram-se descritos no quadro abaixo (Quadro 1):

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

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

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

+++ = método recomendado; ++ = método adequado; + = pode ser usado em alguns casos, mas custo, confiabilidade ou outros fatores limitam sua aplicação; - = não apropriado para esse objetivo. RT-qPCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa; RT-PCR = reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa; C-ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay competitivo; VN = vírus neutralização; IDGA = imunodifusão em gel de ágar, CFT = teste de fixação do complemento.

O isolamento do vírus da LA pode ser realizado em ovos de galinha embrionados ou em culturas de células como células L de cobaio, BHK-21 (rim de hamster recém-nascido), células Vero (rim de macaco verde africano) e células de *Aedes albopictus* clone C6/36 (AA). Também foi descrito isolamento em cultura de células derivadas de *Culicoides sonorensis* livres de vírus da LA (OIE, 2014).

Os métodos de diagnóstico indiretos indicam apenas se o animal teve contato com o vírus e deve ser reconhecido que a maior desvantagem da IDGA para LA é a ausência de especificidade, uma vez que não diferencia anticorpos contra LA de anticorpos contra outros orbivírus como DEH, havendo, portanto reação cruzada. Um animal positivo para LA no teste IDGA, pode indicar que ele teve contato com algum *Orbivirus*, e o mesmo deve ser avaliado por um teste mais específico, como o teste ELISA competitivo (OIE, 2014).

Excelentes exames de diagnóstico direto estão disponíveis para a detecção do vírus da LA, especificamente o RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) que detectam de forma confiável todos os sorotipos e estirpes de LA com elevada sensibilidade e especificidade (HOFMANN et al., 2008; MAYO et al., 2010). Exames de RT-qPCR para sorotipos específicos são também cada vez mais utilizados para a determinação rápida e específica do sorotipo do vírus, sem a necessidade de isolamento do vírus que é caro e demorado (MAAN et al., 2012; MACLACHLAN et al., 2013).

2.9 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial para LA deve ser feito para febre aftosa, podridão dos cascos, poliartrite, ectima contagioso, varíola ovina e caprina (KUSIKULA; KAMBARAGE, 1996), estomatite vesicular, peste dos ruminantes, fotossensibilização por plantas, febre catarral maligna, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina, infecção pelo vírus da parainfluenza-3, infestação por *Oestrus ovis*. Nos bovinos e cervídeos, a DEH pode resultar em sinais clínicos e lesões macro e microscópicas semelhantes aos da LA (CFSPH, 2006).

2.10 Tratamento, prevenção e controle

Não há tratamento específico para LA. É aconselhável reduzir o estresse de animais doentes, confinando-os em áreas fechadas e secas. Infecções secundárias podem ser tratadas com antibióticos apropriados (STOTT, 1999).

O controle deve ser baseado em ações integradas que envolvam o vetor, o hospedeiro e o ambiente. O controle de áreas livres deve focar principalmente no controle de movimento de animais, em regras rígidas de importação e quarentena, geralmente acompanhadas de dois a três testes sorológicos (OIE, 2016). Abrigar os animais em áreas protegidas de mosquitos durante o entardecer e à noite, reduzir a população de vetores com uso de inseticidas e larvicidas (ALFIERI et al., 2007), eliminar os sítios de reprodução dos mosquitos, como locais com acúmulo de água, são medidas que podem ser adotadas (LOBATO, 1999).

A vacinação contra LA, disponível somente para animais domésticos, é usada em diversos países onde a doença é endêmica, para limitar as perdas diretas, minimizar a circulação do vírus e permitir a movimentação de animais (OIE, 2014). A maioria das vacinas é constituída de vírus vivo atenuado e foi desenvolvida para uso no sul da África, onde muitos sorotipos são endêmicos, principalmente para proteger raças de ovelhas exóticas susceptíveis (ALPAR et al., 2009). A vacinação é fundamental para o controle de LA na maioria dos países que apresentam risco de surtos de LA. A vacinação, no entanto, pode ser problemática, dada a quantidade de sorotipos de LA existentes, aliada à imunidade aparentemente específica a cada sorotipo (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

Dentre as desvantagens do uso de vacinas com vírus vivo atenuado, pode-se citar: desenvolvimento da doença em algumas raças de ovelhas susceptíveis, os sorotipos podem ser transmitidos pelos vetores *Culicoides* e podem ocorrer rearranjos entre o vírus da vacina e os sorotipos presentes no campo (MELLOR et al., 2009).

As vacinas inativadas não estavam disponíveis comercialmente na Europa e foram exclusivamente usadas durante o surto que ocorreu na Europa do sorotipo 8 de LA. As vantagens do uso de vacina inativadas são: não apresenta virulência, não

ocorrem rearranjos com outros sorotipos e não atravessa a placenta, o que pode causar perdas reprodutivas. No entanto, a resposta imune é mais lenta quando comparada a vacina com vírus vivo, apresentam alto custo de produção e não há no mercado vacinas disponíveis para todos os sorotipos (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

Muito esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de vacinas contra a LA. As vacinas contra a LA em ruminantes que estão disponíveis comercialmente podem ser atenuadas ou inativadas. A sua atividade protetora é sorotipo-específica, provavelmente devido ao papel chave da proteína externa VP2 na imunidade protetora mediada por células B e T. Assim, em áreas endêmicas onde podem estar presentes vários sorotipos de LA, podem ser necessárias vacinas eficazes contra vários sorotipos (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008).

Além disso, as vacinas contra LA devem ser seguras e devem permitir a diferenciação entre animais vacinados e infectados, a fim de facilitar o comércio. Devido a estes três requisitos (múltiplos sorotipos, segurança e diferenciação entre vacinados e infectados), a vacinação contra LA é uma questão difícil e controversa (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008). Apesar de o Brasil ser considerado endêmico para LA, não há vacinação disponível no país, pois não se sabe a distribuição do vírus no país e nem são conhecidos os sorotipos que ocorrem.

Estratégias para reduzir ou erradicar populações de estádios adultos ou imaturos do vetor poderiam teoricamente ser usadas para controlar a infecção e limitar a disseminação de vírus da LA. Tais estratégias são desafiadoras devido às enormes populações do vetor em muitas regiões, juntamente com grande número de locais de reprodução. O desafio para o controle efetivo de vetor é ainda exacerbado pelo fato de diferentes espécies de mosquitos predominarem em diferentes áreas, e a ecologia de espécies individuais poderem variar substancialmente, tais como as preferências alimentares do hospedeiro, a frequência com que entram em estábulos de gado (atividade endófila e exófila) e a localização e tipo dos seus locais de reprodução que para muitas espécies não são conhecidos plenamente (MACLACHLAN; MAYO, 2013).

Uma variedade de compostos utilizados para controlar os ecto e endoparasitas de bovinos tem potencial eficácia contra *Culicoides*. Estes incluem a

administração tópica de produtos "pour-on", brincos auriculares impregnados ou imersão de animais em compostos sintéticos de piretróide. Os produtos administrados localmente tendem a ter uma eficácia inseticida reduzida na barriga e nas pernas dos animais tratados (CARPENTER; SZMARAGD; TORR, 2007; MULLENS et al., 2001).

O passo fundamental para que o vírus da LA não venha a ser introduzido em um país livre é a identificação dos sorotipos existentes no país exportador e a presença de *Culicoides* competentes para a transmissão de tais sorotipos no país importador (BERNARDES, 2011).

A falta de conhecimento dos sorotipos existentes no Brasil e sua distribuição nos diferentes estados dificultam o controle e a adoção de medidas que evitem a introdução de novos sorotipos no país ou em áreas específicas (COSTA et al., 2006). A realização de estudos que visem definir a área de ocorrência e os sorotipos específicos que ocorrem não só no país, mas na América do Sul como um todo são fundamentais, assim como estudos sobre a ocorrência dos vetores envolvidos na transmissão da LA e estudos sobre a patogenia dos diferentes sorotipos de LA em cervídeos brasileiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Licença, área e animais de estudo

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – protocolo nº 1723/16, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). As atividades de colheita e manejo dos animais selvagens e insetos foram autorizadas pelo ICMBio nº 52364-1.

A área de estudo se restringiu a localização da FCAV e uma propriedade rural particular no Município de Jaboticabal (21°15'22" sul e 48°18'58" oeste, altitude de 605 metros), localizado na região nordeste do estado de São Paulo – Brasil. Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, baseada em dados mensais pluviométricos e termométricos, o clima de região é tropical chuvoso com inverno seco e mês mais frio com temperaturas médias superiores a 18°C (CEPAGRI, Unicamp, 2016).

As amostras biológicas (sangue e tecidos) usadas neste estudo foram oriundas: i) de cervídeos brasileiros de diferentes espécies, de ambos os sexos e idades variadas, pertencentes ao criatório científico do NUPECCE, localizado na FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, ii) amostras de sangue colhidas de bovídeos domésticos como caprinos, ovinos e bovinos, de diferentes idades, machos e fêmeas, mantidos e criados na fazenda da própria FCAV e uma propriedade particular (ovinos), todos distantes no máximo 2,7 Km do NUPECCE.

Na Figura 4 e na Tabela 1 encontram-se relacionados os locais onde foram realizadas as colheitas de material, as espécies e as quantidades amostradas.

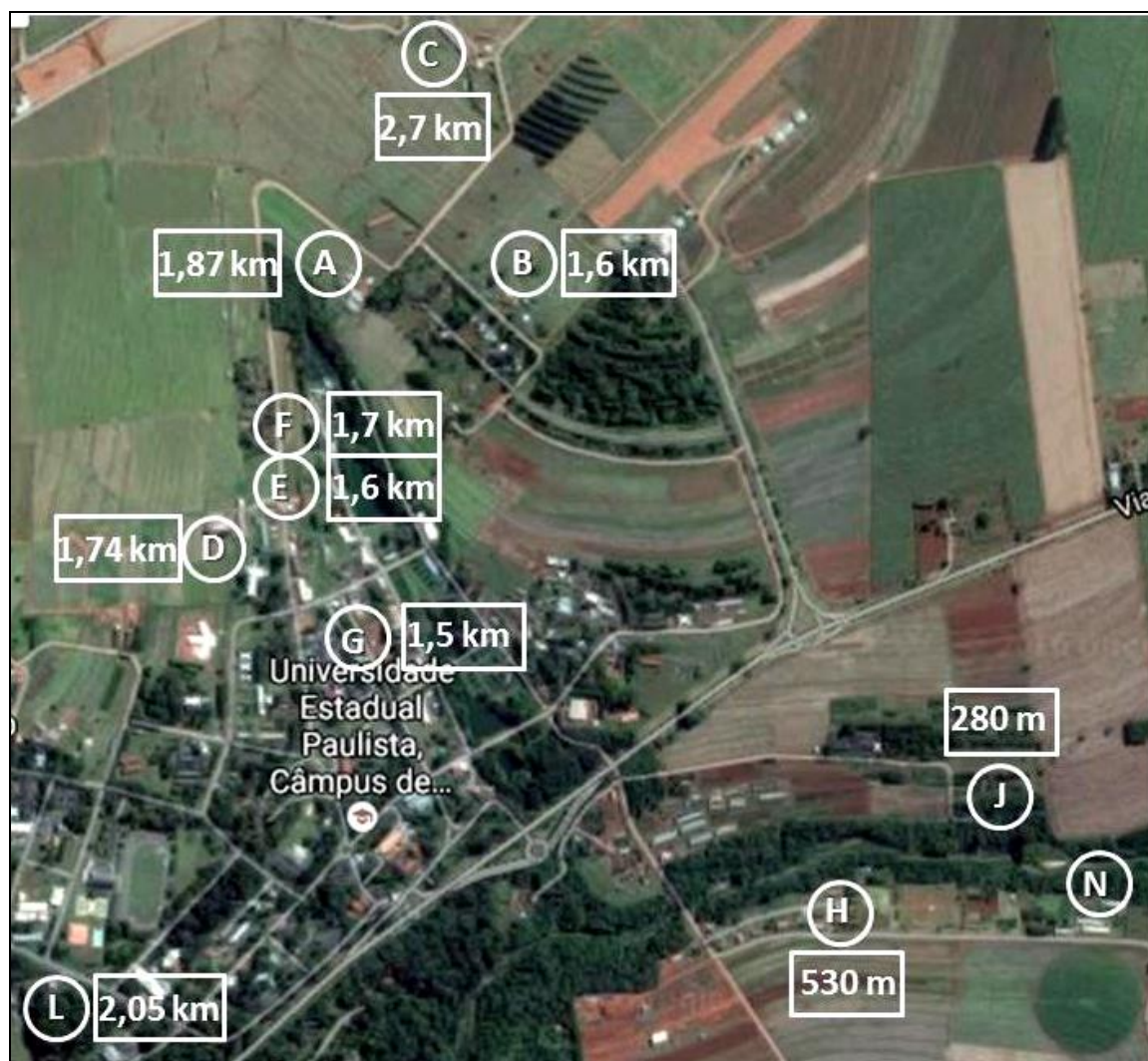


Figura 4. Vista aérea da FCAV e arredores onde eram mantidos os animais estudados. A: Setor de Caprinocultura, B: Setor de Ovinocultura, C: Setor de Digestibilidade (bovinos de corte), D: Setor de Gado de Leite, E: Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos (ovinos), F: Setor de Bioclimatologia (ovinos), G: Hospital Veterinário (ovinos), H: CPPAR (Centro de Pesquisa em Sanidade Animal) (bovinos), J: propriedade particular (ovinos), N: NUPECCE e L: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (ovinos). Os valores dentro dos retângulos indicam as distâncias dos respectivos locais até o NUPECCE.

Tabela 1. Espécie animal e datas das colheitas de amostras realizadas nos diferentes locais amostrados na FCAV e na propriedade particular na cidade de Jaboticabal-SP.

Local	Espécie (número de animais)	Data da colheita
Setor de Caprinocultura	Caprinos (42)	11/06/2015
Setor de Ovinocultura	Ovinos (37)	12/06/2015
Setor de Digestibilidade	Bovinos (60)	04/02/2015
Setor de Gado de Leite	Bovinos (36)	09/06/2015
UAEDM	Ovinos (13)	05/02/2015
Setor de Bioclimatologia	Ovinos (19)	03/02/2015
Hospital Veterinário	Ovinos (27), caprino (1)	28/01/2015
CPPar	Bovinos (36)	03/06/2015
Propriedade particular	Ovinos (58)	19/04/2014
NUPECCE	Cervídeos (69)	2013 a 2015
DMVPRA	Ovinos (20) e caprinos (3)	18/06/2015

UAEDM = Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos; CPPar = Centro de Pesquisa em Sanidade Animal; NUPECCE = Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos; DMVPRA = Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

3.2 Colheita de sangue

Foi realizada colheita de amostras de sangue da veia jugular dos cervídeos, ovinos, bovinos e caprinos utilizando o sistema vacutainer (agulhas 25x7 para colheita de sangue à vácuo, tubos vacutainer de 4 mL contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e tubos de 10 mL sem anticoagulante.

As amostras de sangue com EDTA foram centrifugadas a 4000 x g durante 4 minutos e em seguida foi retirado o plasma. Foram realizadas três lavagens com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% e centrifugações a 4000 x g por 4 minutos a fim de obter o concentrado de hemácias.

O sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 4000 x g por 10 minutos para obtenção do soro. Ambos os materiais (soro e concentrado de hemácias) foram armazenados em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados e congelados em freezer - 20°C até a realização das análises sorológicas e moleculares, que foram feitas no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, em São Paulo – SP, sob supervisão da pesquisadora responsável Dr^a. Edviges Maristela Pituco.

3.3 Análises sorológicas

Para pesquisa de anticorpos contra o vírus da LA foram utilizadas as técnicas de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA) e ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) competitivo em fase sólida (ELISA CFS).

3.3.1 Imunodifusão dupla em gel de ágar

O teste de IDGA utilizado foi o kit comercial “Bluetongue Virus Antibody Test Kit”, da Veterinary Medical Research Development (VMRD). Em placa de petri com ágar gel a 1% em tampão borato foi perfurado com molde padrão de roseta com seis orifícios na periferia e um central, com diâmetro externo de 4 mm e separados a 2 mm equidistantes entre si. O antígeno foi distribuído no orifício central e o soro controle positivo nos três alternados, sentido horário, tendo como referência o orifício superior. Os soros testes foram adicionados nos orifícios restantes. O volume de soro e de antígeno foi de 25 µL.

Após aplicação dos soros, a placa foi incubada por 48 horas à temperatura de 20 a 25°C. A leitura foi feita contra um fundo escuro, usando lâmpada de 40 watts para proporcionar contraste e visualizar as linhas de precipitação que se formaram. Os resultados foram interpretados baseados na formação da linha de precipitação. Assim, o resultado era **negativo** quando se formava uma linha reta entre o soro controle positivo e o antígeno; **positivo**: quando a linha do soro controle se unia à linha de precipitação formada pelo soro teste e o antígeno, formando uma linha contínua e **inconclusivo**: quando a linha do soro controle se curvava em direção ao orifício do soro teste não formando uma linha completa entre o antígeno e o soro teste. As amostras que tiveram resultado inconclusivo foram repetidas.

3.3.2 ELISA competitivo em fase sólida

Para a sorologia pela técnica de ELISA foi usado o kit ELISA produzido pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa tendo sido realizado segundo o protocolo do fabricante. As placas para ELISA de 96 cavidades foram primeiramente sensibilizadas. Após lavá-las com água miliQ e secá-las, foram colocados em cada cavidade 50 µL do antígeno de VLA da diluição de uso (1:1.500) e incubadas por

18h a 4°C. Depois a placa foi retirada e deixada em temperatura ambiente por 1 hora e então lavada com solução salina fisiológica. Após secar a placa, em cada cavidade foram colocados 50 µL de ovoalbumina GV a 1% em PBS, incubada por 1 hora em temperatura ambiente e lavada com salina fisiológica.

Para execução da prova, os soros e reagentes foram estabilizados em temperatura ambiente por 30 minutos antes do uso. Foi preparado o PBSTB (20 µL de PBS, 10 µL de Tween 20 0,05%, 0,2 g de ovoalbumina GII 1%). Na placa auxiliar foram colocados 32 µL de PBSTB nas linhas A – H até a coluna 8. Nas linhas A a F, colunas 10, 11, 12 colocou-se 40 µL de PBSTB; linha G colunas 9 a 12, 40 µL de PBSTB (controle de antígeno) e linha H colunas 9 a 12 o volume de 80 µL de PBSTB (controle branco). Foram então adicionados 8 µL das amostras de soro teste em duplicata (nas linhas A a H, colunas 1 a 8).

Os controles foram colocados nas linhas A e B coluna 9, 50 µL do soro controle forte positivo, diluído 1:25 em PBSTB e nas linhas C e D, coluna 9 foram colocados 50 µL do soro controle fraco positivo, diluído 1:5 em PBSTB. Nas linhas E e F, coluna 9 foram colocados 50 µL do soro controle negativo puro.

Os soros controles foram então diluídos, passando 10 µL às cavidades seguintes com pipeta multicanal, desprezando os 10 µL restantes. Foram adicionados em toda placa 40 µL do anticorpo monoclonal (1:400), exceto no controle branco, sendo as diluições representadas na Figura 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:10	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	C++ 1:50	1:250	1:1250	1:6250
B	S1 1:10	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	C++ 1:50	1:250	1:1250	1:6250
C	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	C+ 1:10	1:50	1:250	1:1250
D	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	C+ 1:10	1:50	1:250	1:1250
E	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	C- 1:2	1:10	1:50	1:250
F	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	C- 1:2	1:10	1:50	1:250
G	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	CAG	CAG	CAG	CAG
H	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	Branco	Branco	Branco	Branco

Figura 5. Configuração da placa para ELISA CFS após aplicação das amostras de soros e suas respectivas diluições para detecção de anticorpos contra vírus da LA.

As placas foram homogenizadas e transferidos 50 µL para a placa sensibilizada, que foram então incubadas em câmara úmida a 37°C por 1 hora, com agitação. A seguir o conteúdo foi descartado e lavado cuidadosamente por 3 vezes com solução de lavagem (500 mL de salina fisiológica e 250 µL de Tween 20). Foi colocado 50 µL de conjugado e incubado em câmara úmida a 37°C por 1 hora sob agitação. O conteúdo foi descartado e as placas lavadas cuidadosamente 4 vezes com solução de lavagem.

A solução de substrato cromógeno foi preparada misturando-se 0,6 mL de ácido cítrico 0,1 M, 7 mL de fosfato de sódio 0,2 M com 11,5 mL de peróxido de hidrogênio diluído 1:1500 e acrescido de 0,01g de OPD (orto-fenil-diamina). Foram acrescidos ainda 50 µL dessa solução de OPD em toda a placa e incubado por 15 minutos no escuro. Para bloquear a reação foi acrescido a cada cavidade da placa

50 µL de ácido sulfúrico 3N. As densidades ópticas ou absorbância foram realizadas em leitor de ELISA com o filtro de 492 nm.

A correlação entre as técnicas de ELISA CFS e IDGA foi determinada pelo coeficiente kappa (THRUSFIELD, 2004), sendo os dois testes aceitos internacionalmente para pesquisa de anticorpos contra o vírus da LA.

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR)

Para investigação da presença do vírus da LA foi utilizada a técnica de RT-qPCR, que foi antecedida pela extração do RNA nas amostras a serem analisadas.

Para extração de RNA de amostras de tecido foram maceradas 50 mg de tecido com 800 µL de Trizol[®] Reagent em cadinho com auxílio de pistilo, previamente autoclavados e esterilizados. Todo o conteúdo foi transferido para microtubo de 1,5 mL. O volume foi medido e acrescentado Trizol até completar 1 mL e agitado no vórtex. Para amostras de sangue, foram misturados 250 µL de papa de hemácias com 750 µL de Trizol e agitados no vórtex. Após incubar por 10 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e homogeneizado em vórtex por 15 segundos; seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se então a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior (aproximadamente 400 µL) foi aspirada e transferida para um novo tubo. O RNA era precipitado com 500 µL de isopropanol e homogeneizado por inversão e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Na sequência o sobrenadante foi aspirado e desprezado em frasco para descarte utilizando ponteira de 1 mL primeiramente e pipetando-se vagarosamente. O volume restante foi retirado com pipeta de 200 µL vagarosamente, com cuidado para não aspirar e desprezar o pellet. Foi então acrescido 1 mL de etanol 75%, para lavagem do pellet e, após homogeneizar por inversão, foi centrifugado a 7.600 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e desprezado em frasco para descarte. O volume final foi retirado com pipeta de 200 µL vagarosamente. O tubo foi então deixado aberto à temperatura ambiente por 10 minutos até secagem do etanol. Após a secagem, o

pellet foi dissolvido em 30 µL de água livre de nuclease (NFW). Ao final da extração, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a realização da próxima etapa.

A extração de RNA dos insetos foi realizado utilizando o QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Os insetos capturados em um mesmo mês foram agrupados em “pools” de 3 a 15 insetos. Não houve mistura dos insetos colhidos em diferentes meses. Ao final da extração as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a realização RT-qPCR.

A reação de RT-qPCR foi baseada no protocolo padronizado e validado pelo Laboratório de Viroses de Bovídeos, utilizando o LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Life Science) e placa LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche Life Science).

Os oligonucleotídeos iniciadores e da sonda de hidrólise foram baseados no segmento genômico 10 (NS3) para detecção de vírus da LA por RT-qPCR conforme recomendado pela OIE (2016) e descrito por Hofmann et al. (2008). As sequências de utilizadas estão apresentadas no Quadro 2 a seguir:

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores do segmento S10 do VLA e sonda de hidrólise utilizadas na reação de RT-qPCR para detecção de vírus da língua azul em bovídeos selvagens e domésticos.

Oligonucleotídeo iniciador	BTV_IVI_F 5'-TGG-AYA-AAG-CRA-TGT-CAA-A-3'
Oligonucleotídeo iniciador	BTV_IVI_R 5'-ACR-TCA-TCA-CGA-AAC-GCT TC-3'
Sonda de hidrólise	BTV_IVI_P 5'-FAM-ARG-CTG-CAT-TCG-CAT-CGT-ACG-C-3' BHQ1

A reação foi realizada num volume total de 20 µL, contendo 7,4 µL de Master Mix LightCycler® 480 RNA Master, 1,3 µL de Activator, 2,8 µL de água livre de nuclease, 1 µL de Enhancer 20X, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 pmol, 0,5 µL de sonda de hidrólise a 10 pmol e 5 µL da amostra a ser testada. Em todas as reações foram utilizados controles negativos (água livre de nuclease) e positivos.

As reações foram realizadas no termociclador Light Cycler 480 II Roche, sendo que as condições de reação para vírus da LA foram um ciclo de 3 minutos a 63°C para síntese de cDNA, um ciclo de 30 segundos a 95°C para desnaturação inicial, 45

ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 segundo para amplificação e 1 ciclo de 10 segundos a 40°C para resfriamento.

3.5 Exame necroscópico, microscópico e colheita de tecidos

No período de 2011 a 2016, 46 cervídeos de diversas espécies, oriundos do NUPECCE vieram a óbito e foram necropsiados (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de cervídeos necropsiados no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, segundo a idade e sexo dos animais, no período de 2011 a 2016.

		<i>Mazama gouazoubira</i>	<i>Mazama nana</i>	<i>Mazama bororo</i>	<i>Blastocerus dichotomus</i>	<i>Mazama nemorivaga</i>	<i>Mazama americana</i>	Híbrido*
Sexo	M	7	-	1	2	2	7	2
	F	9	1	2	1	5	7	-
Idade	Fi	3	-	-	-	1	1	-
	J	1	-	-	-	2	1	-
	A	12	1	3	3	4	12	2
	Total	16	1	3	3	7	14	2

M = macho; F = fêmea; Fi = filhote; J = jovem, A = adulto

*Híbrido = *Mazama nemorivaga* x *Mazama gouazoubira*

Durante o exame necroscópico foram avaliados todos os órgãos, sua localização, aspecto externo, coloração, formato e tamanho. Em seguida foram colhidos fragmentos de diversos órgãos/tecidos, que foram fixados em solução de formalina a 10% tamponados por 24 horas, destinados para histopatologia. Outros fragmentos (pulmão, fígado, baço, coração e linfonodo poplíteo) foram colhidos e congelados individualmente a -20°C em microtubos para posterior análise molecular por RT-qPCR para detecção do VLA.

O material fixado foi processado para histologia, incluindo os processos de desidratação, diafanização, parafinização e emblocados em parafina. Foram feitos cortes de 5µm de espessura que posteriormente foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio de luz. Essa etapa foi realizada no Laboratório

de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.6 Colheita e identificação dos insetos

Foram utilizadas três armadilhas luminosas convencionais de luz negra (Figura 6 e 7), contendo no fundo um recipiente com 500 mL de água e uma gota de detergente (para romper a tensão superficial da água), onde os insetos capturados ficaram armazenados, conforme preconizado por Goffredo e Meiswinkel (2004) com modificações.

As armadilhas foram colocadas no NUPECCE, sendo uma dentro do galpão (onde se encontravam cervídeos de diferentes espécies, confinados individualmente em baias) e duas armadilhas fora dos galpões, próximo aos piquetes, nos quais ficavam cervídeos de diferentes espécies.



Figura 6: Armadilha luminosa de luz negra convencional durante fim da tarde, quando era ligada.



Figura 7: Armadilha luminosa de luz negra convencional ligada durante a noite.

As armadilhas foram ligadas no final da tarde (entre 18:00h e 19:00h) e a retirada dos insetos capturados nas armadilhas eram realizadas no início da manhã

(entre 07:00h e 8:00h) quando as armadilhas eram desligadas. Foram realizadas várias colheitas de insetos durante o período do estudo, nas diversas estações do ano, tanto em épocas quentes e chuvosas, quanto frias e secas (Apêndice A).

Os insetos capturados foram armazenados em álcool 70% e identificados quanto à família utilizando diagnóstico morfológico de acordo com Brown et al. (2009). A classificação dos insetos foi realizada pela técnica Maria Isabel Protti de Andrade Balbi no Laboratório de Morfologia e Evolução de Díptera, do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Dalton de Souza Amorim. Após a classificação os insetos foram armazenados em álcool 70% a temperatura ambiente até realização das análises moleculares de RT-qPCR (aproximadamente sete a 18 meses).

3.7 Análise estatística

Os cálculos da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos das reações de sorologia foram feitos de acordo com as seguintes fórmulas:

- Sensibilidade = $\text{Positivos verdadeiros} / \text{Positivos verdadeiros} + \text{Falsos negativos}$
- Especificidade = $\text{Negativos verdadeiros} / \text{Falsos positivos} + \text{Negativos verdadeiros}$
- Valor preditivo positivo = $\text{Positivos verdadeiros} / \text{Positivos verdadeiros} + \text{Falsos positivos}$
- Valor preditivo negativo = $\text{Negativos verdadeiros} / \text{Falsos negativos} + \text{Negativos verdadeiros}$
- Acurácia = $\text{Positivos verdadeiros} + \text{Negativos verdadeiros} / \text{Valor total de soros}$

A concordância entre as técnicas de IDGA e ELISA-CFS foi estabelecida pelo índice kappa, determinado pelo programa de Cálculos estatísticos básicos para testes diagnósticos versão 1999 (BRAILE; GODOY, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doenças hemorrágicas são enfermidades importantes para cervídeos em cativeiro no Brasil. Vários plantéis têm sido acometidos por doenças hemorrágicas de etiologia não elucidada, que se apresentam de forma sazonal, em estações úmidas e quentes, atingindo cerca de 40% do rebanho e levando à morte de animais (ARITA et al., 1997). Após a descrição da enfermidade, acometendo cervídeos brasileiros do criatório científico do NUPECCE (DUARTE; ARITA, 1992), também começou a ser relatada em zoológicos e outros criatórios (MORATO et al., 1993). Esses animais apresentavam sinais clínicos e lesões sugestivas de doenças hemorrágicas, como LA e DEH, porém não havia na época o diagnóstico do agente etiológico envolvido (DUARTE; ARITA, 1992; MORATO et al., 1993; ARITA et al., 1997).

Na América do Norte, sabe-se que o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) é altamente susceptível ao vírus da LA e desenvolve coagulação intravascular disseminada, como consequência do dano endotelial induzido pelo vírus da LA (HOWERTH; GREENE; PRESTWOOD, 1988). Dados sobre doenças hemorrágicas acometendo ruminantes selvagens na América do Sul são escassos, limitando-se na maioria dos casos a levantamentos sorológicos. Em 2013 foi relatado o primeiro isolamento de vírus da DEH em veado-catingueiro que veio a óbito em um zoológico em Santa Catarina (FAVERO et al., 2013) e também a notificação de novos sorotipos de LA (sorotipos 3, 14, 18, 19 e 22) em surtos que acometeram veados-bororós em Foz do Iguaçu, Paraná (OIE, 2016).

A interpretação dos resultados das amostras de soro testadas pra VLA pela técnica de IDGA foi realizada de acordo com a formação de linha de precipitação, conforme demonstrado na Figura 8. Das 428 amostras de soro analisadas foram reagentes para o vírus da LA pelo teste de IDGA: 47,43% (37/78) das amostras de soro de cervídeos; 90,90% (120/132) das amostras de bovinos; 55,49% (96/173) das amostras de ovinos e 19,56% (9/46) das amostras de caprinos.

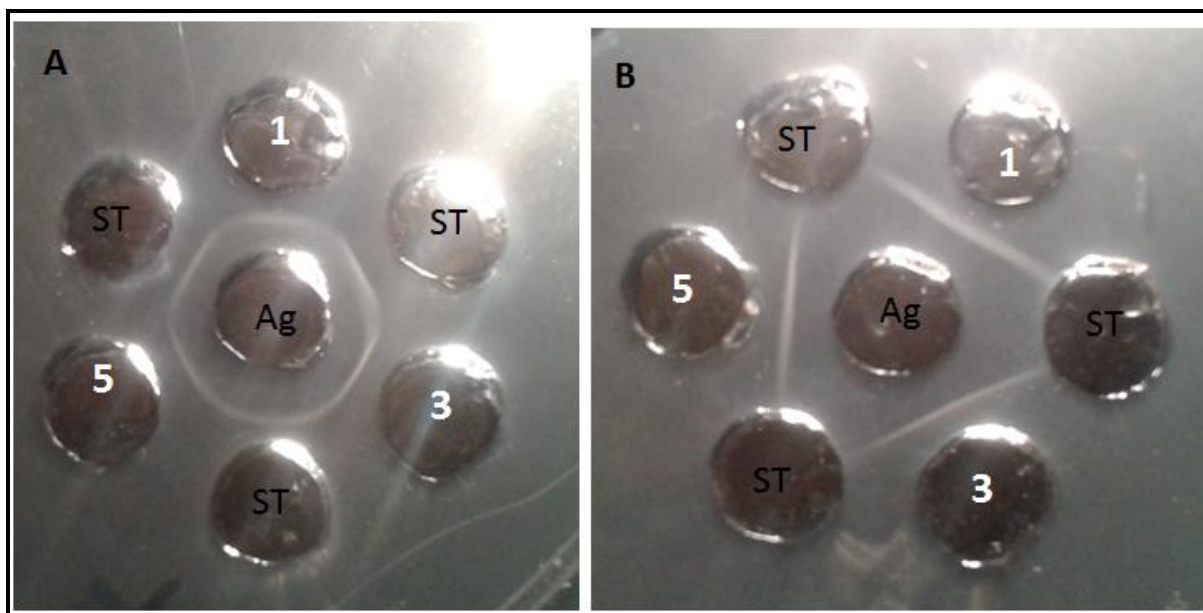


Figura 8. Interpretação do exame de imunodifusão dupla em gel de ágar. A: amostras ST reagentes para o vírus da LA, sendo as amostras 1, 3 e 5 os soros controles positivos. B: amostras ST não reagentes para o vírus da LA, sendo as amostras 1, 3 e 5 os soros controles positivos.
Ag = antígeno; ST = soro teste

Das mesmas 428 amostras de soro analisadas foram reagentes para o vírus da LA pelo teste ELISA CFS: 38,46% (30/78) das amostras de cervídeos; 93,18% (123/132) das amostras de bovinos; 60,69% (105/173) das amostras de ovinos e 23,91% (11/46) das amostras de caprinos.

As tabelas a seguir mostram a correlação entre as duas técnicas sorológicas empregadas no presente estudo, nas espécies de cervídeos, bovinos, ovinos e caprinos, respectivamente (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

Tabela 3. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de cervídeos.

CERVÍDEOS		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA CFS	Positivo	29	1	30
	Negativo	8	40	48
	Total	37	41	78

A concordância observada entre os resultados dos testes para as amostras de cervídeos foi de 0,88, dando um índice kappa de 0,77 demonstrando uma boa

concordância. O teste apresentou sensibilidade de 78,4%, especificidade de 97,5%, valor preditivo positivo de 96,7% e valor preditivo negativo de 83,3%.

Tabela 4. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de bovinos.

BOVINOS		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA CFS	Positivo	120	3	123
	Negativo	0	9	9
	Total	120	12	132

A concordância observada entre os resultados dos testes para as amostras de bovinos foi de 0,97, dando um índice kappa de 0,85 demonstrando uma concordância muito boa. O teste apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 75%, valor preditivo positivo de 97,6% e valor preditivo negativo de 100%.

Tabela 5. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de ovinos.

OVINOS		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA CFS	Positivo	96	9	105
	Negativo	0	68	68
	Total	96	77	173

A concordância observada entre os resultados dos testes para as amostras de ovinos foi de 0,95, dando um índice kappa de 0,89 demonstrando uma concordância muito boa. O teste apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 88,3%, valor preditivo positivo de 91,4% e valor preditivo negativo de 100%.

Tabela 6. Distribuição da frequência de soropositividade em relação aos métodos sorológicos IDGA e ELISA CFS empregados nas amostras de caprinos.

CAPRINOS		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA CFS	Positivo	9	2	11
	Negativo	0	35	35
	Total	9	37	46

A concordância observada entre os resultados dos testes para as amostras de caprinos foi de 0,96, dando um índice kappa de 0,87 demonstrando uma concordância muito boa. O teste apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 94,6%, valor preditivo positivo de 81,8% e valor preditivo negativo de 100%.

Os resultados obtidos a partir dos testes sorológicos condizem com os encontrados em literatura, que indicam alta soroprevalência para vírus da LA em regiões de clima tropical e subtropical da América do Sul (LOBATO et al., 2015) o que demonstra a existência de sorotipos de VLA nos animais da região estudada.

Vale salientar que o teste de IDGA para VLA tem a desvantagem de não ser específico, portanto não diferencia anticorpos contra VLA de anticorpos contra outros orbivírus como vírus da DEH. Um animal positivo para LA no teste IDGA, pode indicar que ele teve contato com outros *Orbivirus*, e o mesmo deve ser testado novamente usando um teste mais específico, como o ELISA competitivo (OIE, 2014).

Nos cervídeos testados no presente estudo, o teste de IDGA revelou maior número de animais reagentes quando comparado ao teste ELISA (Tabela 3), provavelmente devido à reação cruzada com outros *Orbivirus*. É provável que esses animais tenham anticorpos contra o vírus da DEH, uma vez que estudo realizado por Pandolfi (1999) detectou 9% do plantel de 22 animais sorologicamente positivos para DEH em anos anteriores. Apesar de o teste ELISA CFS ter maior sensibilidade, somente um cervídeo apresentou resultado reagente no teste ELISA e não reagente no IDGA (Apêndice D).

Nas demais espécies (bovinos, ovinos e caprinos), o teste ELISA CFS revelou maior número de animais reagentes do que no IDGA, conforme pode ser observado

nas Tabelas 4, 5 e 6. Este fato pode ser explicado pela maior sensibilidade que o teste apresenta.

A grande importância dos bovinos na epidemiologia da LA é que essa espécie tem maior capacidade de manutenção do vírus por apresentar longo período de viremia, podendo atuar como reservatórios e infectar os vetores que transmitem o vírus para os cervídeos. Nos bovinos, o vírus é detectado no sangue durante 35 a 60 dias pós-infecção, permanecendo por até 160 dias (KATZ et al., 1994).

Em estudo sorológico realizado em ruminantes domésticos que viviam nas proximidades do NUPECCE foram detectados anticorpos para LA principalmente em bovinos (97%, n=73) e ovinos (87%, n=54) (PANDOLFI, 1999), sugerindo que esses animais poderiam ser reservatórios do vírus para os cervídeos acometidos no NUPECCE e fonte de infecção para os insetos vetores.

No presente estudo os bovinos apresentaram também maior soroprevalência (90,90% no IDGA e 93,18% no ELISA CFS) quando comparado às outras espécies estudadas. Devido à constante chegada e saída de ruminantes domésticos que ocorre na região próxima ao NUPECCE, esses animais poderiam ser considerados fonte de infecção para os cervídeos do criadouro.

No presente estudo foram analisadas por RT-qPCR para VLA 69 amostras de sangue de cervídeos dos quais 10,14% (7/69) foram positivos. Das 132 amostras de bovinos, 0,75% (1/132) foram positivos para VLA. Dos ovinos e caprinos, 10,65% (18/169) e 9,09% (4/44) foram positivos para VLA por RT-qPCR, respectivamente.

O bovino positivo para VLA por RT-qPCR era pertencente ao CPPar, e dentre os ovinos positivos: 9 eram da propriedade particular, 5 do Setor de Ovinocultura e 4 do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal. Já dentre os caprinos, todos eram pertencentes ao Setor de Caprinocultura da FCAV, Unesp de Jaboticabal.

Dos cervídeos positivos para LA na RT-qPCR de amostras de sangue, somente um animal veio a óbito decorrente da enfermidade. O animal era da espécie *Mazama gouazoubira*, denominado “Ventania”, de 1 ano e 9 meses de idade e havia sido transferido da baia (barracão telado) para um piquete aberto dias antes do óbito. Os únicos sinais clínicos apresentados um dia antes do óbito foram edema em face e protusão da língua. A partir do soro desse animal foi realizado IDGA e

ELISA, ambos reagentes para vírus da LA, demonstrando que o animal provavelmente já havia tido contato com o vírus previamente. Os testes sorológicos realizados a partir de sangue colhido do mesmo animal, nove meses antes do óbito não foram reagentes para LA, tanto no IDGA, quanto no ELISA CFS (Apêndice D).

No presente estudo, com exceção de um animal da espécie *Mazama gouazoubira* ("Ventania"), os demais cervídeos com resultado positivo na RT-qPCR para VLA no sangue apresentavam-se aparentemente saudáveis no momento da coleta, sem sinais clínicos que sugerissem infecção.

Considerando que grande parte da América do Sul está localizada em uma área endêmica para ocorrência de LA, espera-se que a doença clínica seja raramente observada. Além disso, considerando a variabilidade dos sinais clínicos e o número de outras doenças endêmicas que têm aspecto clínico semelhante, é possível supor que os casos clínicos sejam subnotificados (LOBATO et al., 2015). No entanto, na América do Sul, até então, somente surtos de LA acometendo ovinos e caprinos no estado do Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul foram descritos no Brasil (CLAVIJO et al., 2002; ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014).

Na Europa, estudo realizado em cervídeos de vida livre detectou o vírus da LA em populações de veado-vermelho (*Cervus elaphus*) sem que apresentassem sinais clínicos da doença, gerando a hipótese de que a manutenção e circulação do vírus da LA envolvam esses cervídeos (LORCA-ORÓ et al., 2014). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os encontrados no estudo de Lorca-Oró et al. (2014), uma vez que o vírus foi detectado em seis animais que também não apresentavam sinais clínicos de infecção por LA.

Em um estudo retrospectivo de detecção do vírus da LA realizado em amostras de cervídeos pertencentes ao NUPECCE, no qual foram selecionados animais que apresentaram sinais clínicos e alterações macroscópicas sugestivas de doença hemorrágica, cinco cervídeos foram positivos para LA na RT-qPCR (KAWANAMI, 2012). Uma vez que no presente estudo também foram diagnosticados animais positivos, tanto com sinais de infecção quanto animais sadios, sugere-se que diferentes sorotipos circulem na região, cuja patogenicidade para os cervídeos é também variável.

Durante os anos de 2011 – 2016 foram realizadas um total de 46 necropsias em cervídeos que vieram a óbito oriundos do NUPECCE, desses, quatro animais foram positivos para VLA na RT-qPCR a partir de amostras de tecidos (coração, fígado, baço, pulmão e linfonodo). Os dados dos animais estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados de cervídeos pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) que foram positivos para vírus da LA pela RT-qPCR, realizadas nas amostras de órgãos colhidos durante as necropsias.

Identificação	Espécie	Idade	Sexo	Data do óbito
32772 – “Nanda”	<i>M. americana</i>	1 ano e 7 meses	fêmea	24/01/2011
35186 – “Alexandre”	<i>M. americana</i>	12 anos	macho	24/06/2012
35746 – “Nina”	<i>M. gouazoubira</i>	9 anos	fêmea	07/02/2013
37087 – “Ventania”	<i>M. gouazoubira</i>	1 ano e 9 meses	macho	07/01/2014

As principais alterações macroscópicas observadas nesses animais foram: espuma sanguinolenta em traqueia, pulmão com coloração vermelho escuro em todo o órgão (Figura 9 A), linfonodos com aumento de volume, petéquias e hemorragia em endocárdio e epicárdio (Figura 9 B). Tais alterações corroboram com dados citados em literatura (HOFF; TRAINER, 1981; PARSONSON, 1990; ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014).

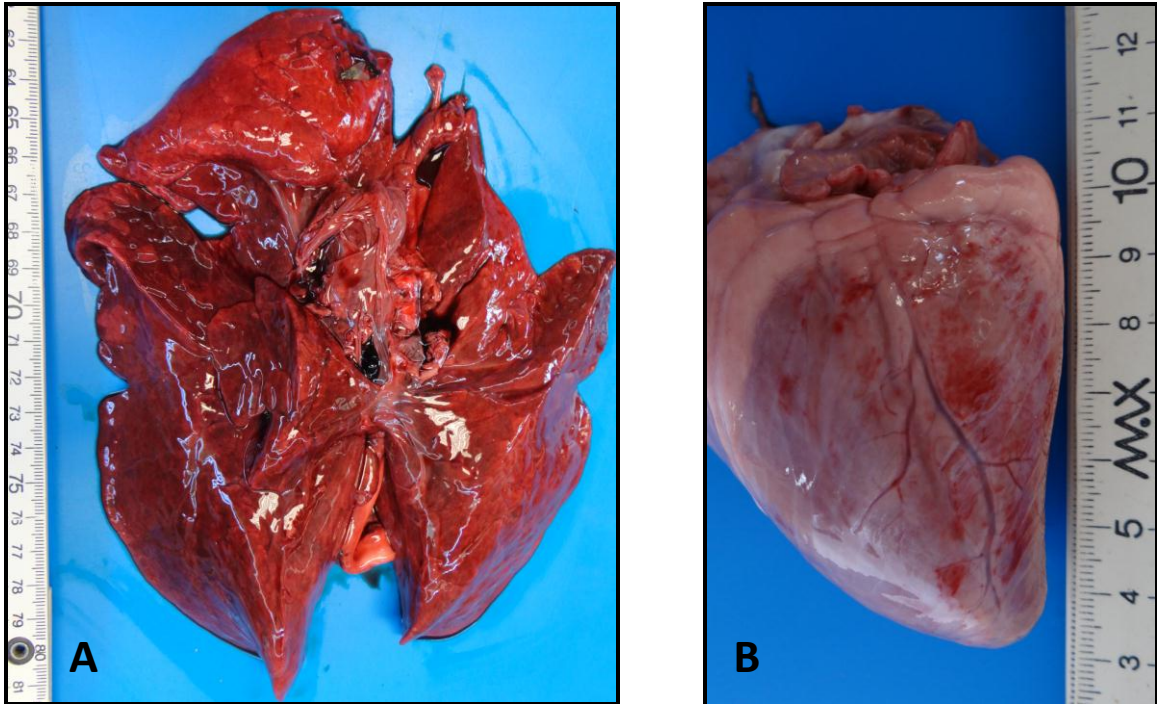


Figura 9: Aspecto macroscópico de órgãos de *Mazama gouazoubira* necropsiado. Animal positivo para LA na RT-qPCR **A:** Pulmão com coloração avermelhada em todo extensão. **B:** Coração com áreas hemorrágicas em epicárdio.

No exame histopatológico dos animais positivos as principais alterações observadas foram: congestão e hemorragia em linfonodos (Figura 10 A); infiltrado inflamatório polimorfonuclear e hemorragia moderada em vários órgãos como língua, rim e tonsila (Figura 10 B); e edema e congestão pulmonar.

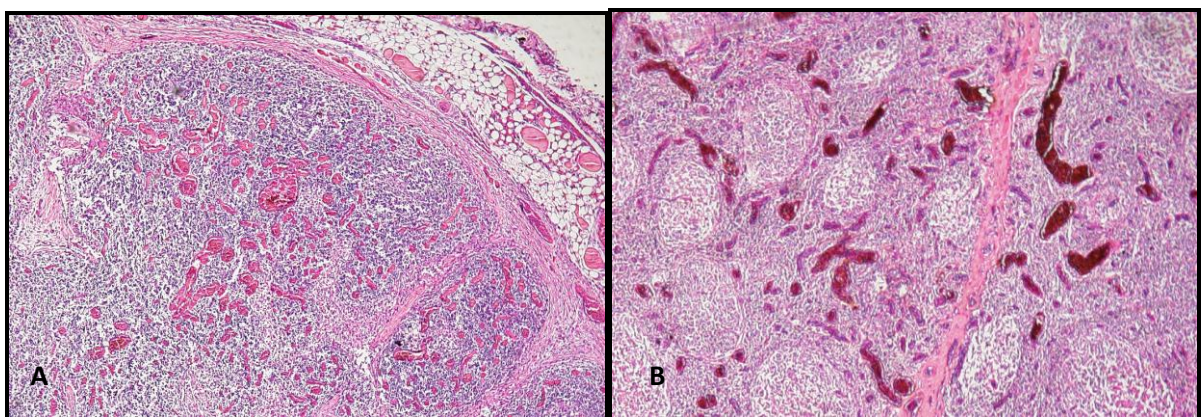


Figura 10. Fotomicrografia de órgãos de veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) acometido por língua azul. A: linfonodo submandibular apresentando moderada hemorragia multifocal. B: tonsila com moderada hemorragia multifocal (4x, Coloração HE).

As alterações histológicas observadas nos animais positivos do presente estudo estão associadas ao dano vascular primário causado pela replicação viral (OSBURN, 2007), aumentando a permeabilidade vascular, favorecendo a formação de edema nos tecidos, principalmente o pulmonar, e formando trombos e consequentes infartos (MACLACHLAN, 2004).

Dos quatro animais positivos para vírus da LA pela técnica de RT-qPCR, de acordo com a Tabela 5, pode-se observar que dois animais que vieram a óbito eram jovens, e de acordo com estudo de Gaydos et al. (2002), anticorpos maternos contra VLA e vírus da DEH em veado-da-cauda-branca permaneceram por até 6 meses nos filhotes e anticorpos neutralizantes por até 4 meses, o que poderia explicar a maior susceptibilidade à infecção por LA que os animais do presente estudo apresentaram.

Dos quatro cervídeos necropsiados que foram positivos para LA na RT-qPCR, três deles vieram a óbito nos meses de janeiro e fevereiro, o que corrobora com Mellor et al. (2000), que afirmaram que o clima quente e chuvoso favorece a ocorrência do vetor, aumentando assim as chances de infecção.

Os insetos colhidos (n=1291) no período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016 (Tabela 8) foram separados nas famílias Ceratopogonidae (n=758) (Figura 11 A e B), Psychodidae (n=441) (Figura 12 A e B) e Simuliidae (n=90) (Figura 13 A e B). As quantidades colhidas em cada dia, mês e ano encontram-se no Apêndice A.

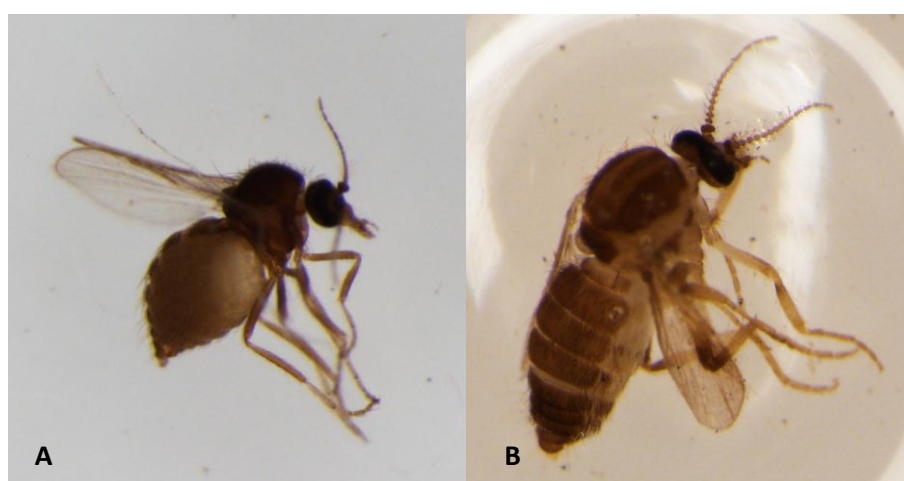


Figura 11 A e B. Mosquitos da família Ceratopogonidae.

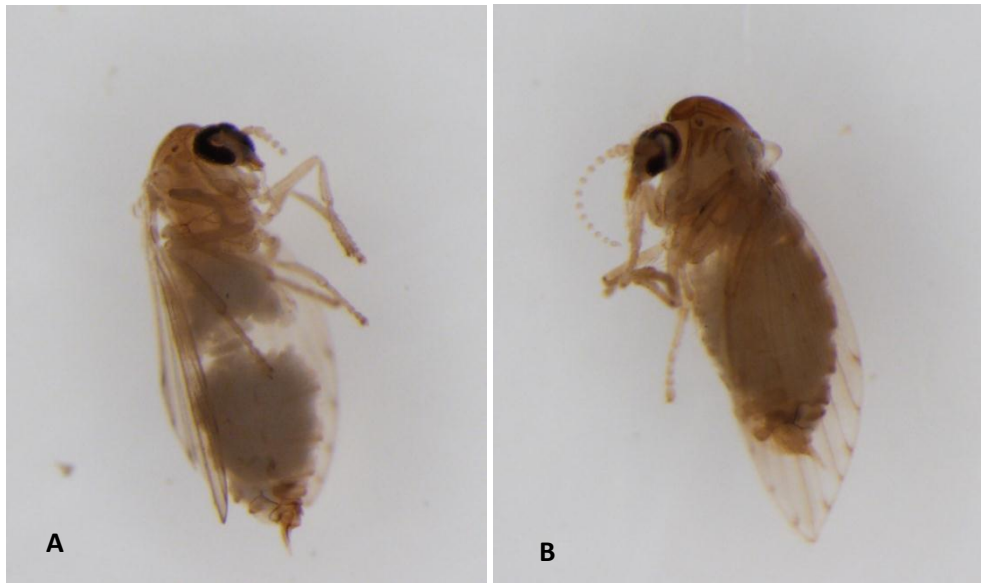


Figura 12 A e B. Mosquitos da família Psychodidae.

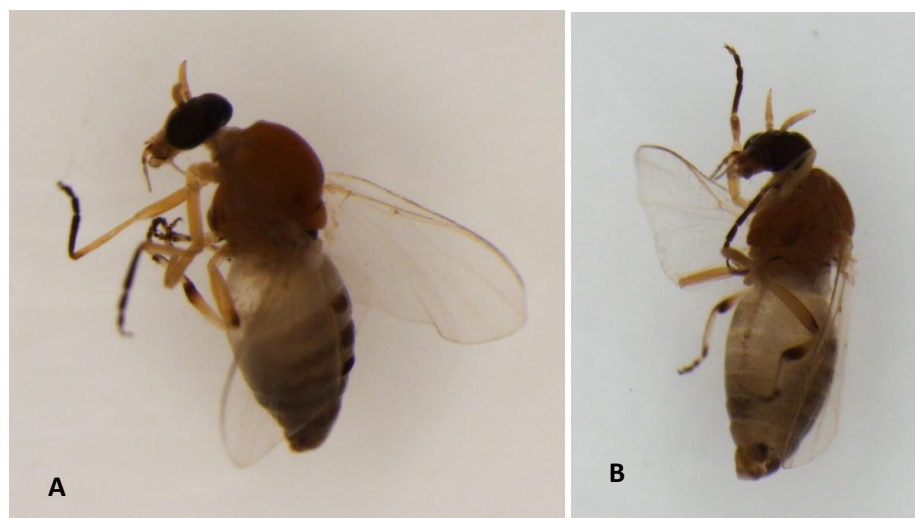


Figura 13 A e B. Mosquitos da família Simuliidae.

Tabela 8. Número de insetos das famílias Ceratopogonidae, Psychodidae e Simuliidae colhidas no período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016 no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, Unesp, Jaboticabal.

Mês/ano	Número de insetos colhidos		
	Ceratopogonidae	Psychodidae	Simuliidae
Dez/2014	38	2	21
Jan/2015	199	17	58
Fev/2015	43	7	5
Mar/2015	9	2	0
Jun/2015	22	32	0
Jul/2015	49	216	0
Ago/2015	13	78	1
Set/2015	21	4	1
Out/2015	98	11	0
Nov/2015	37	4	1
Dez/2015	142	16	4
Jan/2016	87	52	1
Total	758	441	92

A Figura 14 mostra os dados climáticos do município estudado, cuja temperatura e precipitação são favoráveis ao desenvolvimento do vetor. Pode-se observar que as chuvas se concentram principalmente nos meses de verão (dezembro, janeiro e fevereiro), período também em que houve captura de maior número de insetos da família Ceratopogonidae, família a qual pertence o gênero *Culicoides*, vetor conhecidamente envolvido na transmissão do vírus da LA. Nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro ocorreram também as médias mais elevadas de temperaturas, sendo que temperatura e umidade são variáveis que influenciam a dinâmica populacional do vetor, favorecendo a reprodução e a atividade dos mesmos (CHAGAS; PINHEIRO, 2004).

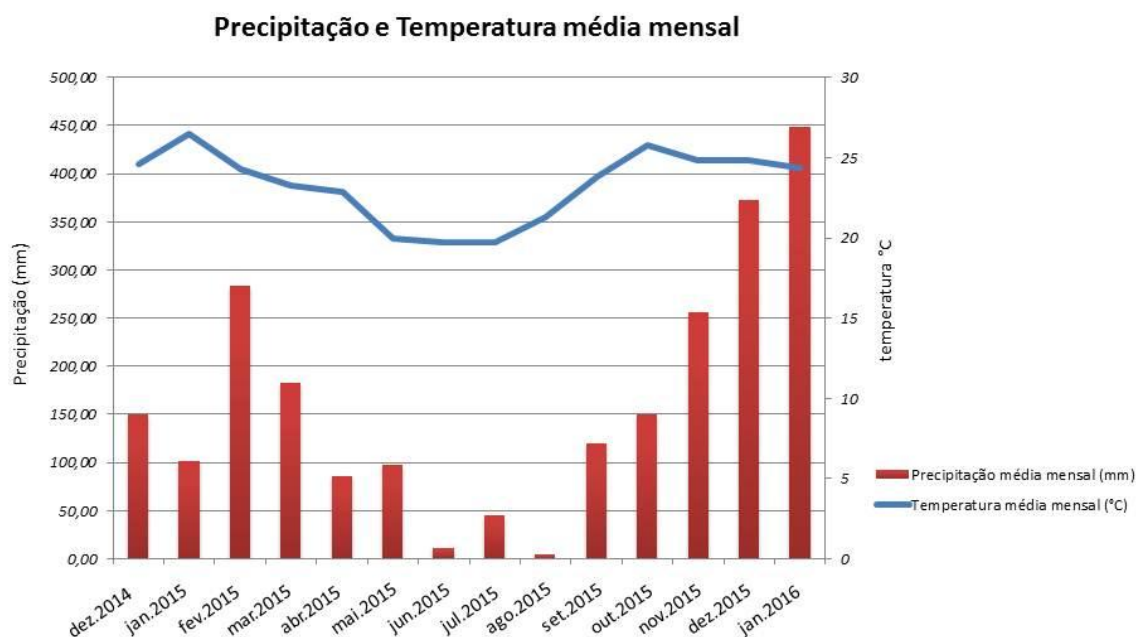


Figura 14. Gráfico com as médias de chuvas e temperaturas de dezembro de 2014 a janeiro de 2016. (Fonte: Estação Agroclimatológica, Unesp - Jaboticabal)

Fatores ambientais, como variáveis climáticas (por exemplo, temperatura e precipitação), possuem uma grande influência no ciclo de vida de artrópodes vetores, incluindo os *Culicoides*. Em áreas tropicais, por exemplo, a temperatura pode desempenhar um papel importante, pois temperaturas mais elevadas irão favorecer o desenvolvimento larval mais rápido e com isso o aumento da população de insetos. A precipitação também favorece os *Culicoides* provavelmente por melhorar os locais de reprodução. O teor de água do solo é um fator importante na determinação da sua adequação para reprodução, e é provável que mais chuva forneça mais ou melhores locais de reprodução (MELLOR et al., 2000).

Especificamente, a temperatura pode ter impactos dramáticos nos parâmetros de história de vida de *Culicoides sonorensis* (LYSYK; DANYK, 2007). Além disso, a temperatura ambiente influencia a replicação de arbovírus dentro do vetor, incluindo os orbivírus dentro dos *Culicoides* (MULLENS et al., 1995, PAWESKA et al., 2002,

CARPENTER et al., 2011). Temperaturas entre 15 a 30°C diminuem o tempo de incubação extrínseco, que é o período entre a ingestão de sangue contaminado com orbivírus e a habilidade do vetor em transmitir o patógeno (WITTMANN et al, 2002).

No presente estudo, as temperaturas médias no período da colheita de insetos variaram de 18,1°C a 26,5°C. Mesmo durante o inverno, a temperatura média se encontra dentro dos valores descritos como possíveis para a reprodução e ocorrência dos vetores. Por outro lado, nos meses com temperaturas mais baixas, a precipitação média mensal também foi menor (junho/2015 = 11,6 mm; julho/2015 = 45 mm e agosto/2015 = 4,4 mm), o que diminui os locais de reprodução dos insetos, diminuindo assim a quantidade de vetores e da transmissão dos Orbivirus.

Todas as amostras dos insetos hematófagos coletadas e analisadas pela RT-qPCR para vírus da LA foram negativas. Uma das hipóteses para explicar esse resultado poderia ser o tempo de permanência dos insetos em álcool 70° em temperatura ambiente (que variou de sete a 18 meses) antes da sua identificação para posterior processamento pela técnica de RT-qPCR. A conservação dos insetos em álcool 70° é o método utilizado para posterior identificação entomológica, porém para identificação molecular o ideal seria o congelamento rápido a -80 graus para conservar o material genético. A fim de evitar a conservação em álcool 70° e possível degradação de material genético, o material ao ser coletado poderia ser dividido, onde parte do material seria destinada à identificação morfológica e parte ele à identificação molecular, de acordo com as técnicas de conservação mais adequadas para cada técnica.

Por outro lado, caso a conservação dos insetos em álcool 70° não tenha interferido no resultado negativo de todas reações de RT-qPCR para VLA, pode-se sugerir que algum outro vetor possa estar envolvido na transmissão do VLA entre os ruminantes domésticos e selvagens.

O Brasil é considerado endêmico para LA, porém ainda existem muitas lacunas em relação às informações sobre distribuição e ocorrência de espécies de vetores de orbivírus existentes na América do Sul e até hoje ainda não foi isolado nem o vírus da LA nem da DEH de insetos vetores neste continente (LOBATO et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

O vírus da língua azul ocorre na região do município de Jaboticabal, uma vez que os cervídeos pertencentes ao criatório do NUPECCE, localizado na Unesp, e os ruminantes domésticos (ovinos, caprinos e bovinos) pertencentes a locais próximos ao criatório possuem uma elevada soropositividade contra o vírus.

Foi possível verificar também que cervídeos que vieram a óbito apresentando sinais clínicos e lesões macro e microscópicas sugestivas de LA, foram positivos para detecção do VLA utilizando a RT-qPCR. Amostras de sangue testadas no presente estudo também foram positivas para VLA por RT-qPCR sendo os ovinos e cervídeos as espécies que apresentaram maior positividade.

Apesar de identificar a presença de mosquitos da família Ceratopogonidae, a qual pertence o gênero *Culicoides*, que é conhecidamente o vetor da LA, o VLA não foi detectado utilizando a técnica de RT-qPCR. A região do estudo é considerada endêmica devido à alta soroprevalência observada principalmente nos bovinos, mas também nos ovinos e cervídeos e a detecção do material genético do VLA no sangue e nos tecidos dos animais sintomáticos e assintomáticos estudados.

6 REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z. I. P. Reoviridae. In: FLORES, E. F. (org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: editora UFSM, 2007, p. 773-807.
- ALPAR, H. O.; BRAMWELL, V. W.; VERONESI, E.; DARPEL, K. E.; PASTORET, P.; MERTENS, P. P. C. Bluetongue virus vaccines past and present. In: MELLOR, P. S.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. P. C. **Bluetongue**, 1 ed. London: Academic Press, 2009. p. 397-428.
- ANTONIASSI, N. A. B.; PAVANI, S. P.; RIBEIRO, L. A. O.; SILVA, M. S.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30 (12), p. 1010-1016, 2010.
- ANTHONY, S.; JONES, H.; DARPEL, K. E.; ELLIOTT, H.; MAAN, S.; SAMUEL, A.; MELLOR, P. S.; MERTENS, P. P. C. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 188–197, 2007.
- ARADAIB, I. E.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. Detection of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes 1 and 2 in cell culture and clinical samples using polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.143-147, 1994.
- ARITA, G. M. M.; MORATO, R. G.; DUARTE, J. M. B. Língua azul e/ou doença epizootica hemorrágica. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e Conservação dos Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1997.
- BALARO, M. F. A.; LIMA, M. S.; DEL FAVA, C.; OLIVEIRA, G. R.; PITUCO, E. M.; BRANDÃO, F. Z. Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26 (4), p. 567–570, 2014.
- BERNARDES, N. T. C. G. **Soroprevalência da língua azul em bovinos do Estado de SP, 2001**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente) – Instituto Biológico, São Paulo, 2011.

BOUWKNEGT, C.; VAN RIJN, P. A.; SCHIPPER, J. J. M.; HÖLZEL, D.; BOONSTRA, J.; NIJHOF, A. M.; VAN ROOIJ, E. M. A.; JONGEJAN, F. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. **Experimental and Applied Acarology**, v. 52, p.183–192, 2010.

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*, v. 45, p. 1386 - 1388, 1984.

BOYLE, D. B.; AMOS-RITCHIE, R.; BROZ, I.; WALKER, P. J.; MELVILLE, L.; FLANAGAN, D.; DAVIS, S.; HUNT, N.; WEIR, R. Evolution of Bluetongue Virus Serotype 1 in Northern Australia over 30 Years. **Journal of Virology**, v. 88 (24), p. 13981–13989, 2014.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. **Programas para cálculos estatísticos S diagnostico. For Windows v. 1.8, 1999.** Disponível em <<http://www.braile.com.br/testscientific.htm#braile>>. Acesso em Dezembro de 2016.

BROWN, B. V.; BORKENT, A.; CUMMING, J. M.; WOOD, D. M.; WOODLEY, N. E.; ZUMBADO, M. A. **Manual of Central American Diptera.** Ottawa: NRC Research Press, 2009, 714 p.

CARPENTER, S.; SZMARAGD, C.; TORR, S. Bluetongue and midge control. **Veterinary Record**, v. 161, p. 633, 2007.

CARPENTER, S. A.; WILSON, A.; BARBER, J.; VERONESI, E.; MELLOR, P.; VENTER, G.; GUBBINS, S. Temperature dependence of the extrinsic incubation period of orbiviruses in *Culicoides* biting midges. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1–8, 2011.

CEPAGRI - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura, Meteorologia Unicamp. Clima dos municípios paulistas. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>>. Acesso em: 25 out. 2016.

CFSPH. **The Center for Food Security & Public Health.** Diseases caused by the epizootic hemorrhagic disease virus serogroup, 2006. Disponível em: <<http://www.cfsp.ia.state.edu/Factsheets/pdfs/bluetongue.pdf>>. Acesso em: 20.jun.2015.

CHAGAS, A. C. S.; PINHEIRO, R.R. **Língua azul: conhecer para prevenir**. Embrapa Caprinos, 34 p., 2004. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos/busca-de-publicacoes/-/publicacao/531308/lingua-azul-conhecer-para-prevenir>>. Acesso em: 15 jun.2015.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J. W. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **The Veterinary Record**, v. 151, p. 301-302, 2002.

COSTA, J. R. R.; LOBATO, Z. I. P.; HERRMANN, G. P.; LEITE, R. C., HADDAD, J. A. P. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 273-275, 2006.

DANIELS, P.; LUNT, R.; PRITCHARD, I. Bluetongue viruses in Australasia and East Asia. In: MELLOR, P.; MATTHEW, B. e MERTENS, P. (Eds), **Bluetongue (Biology of Animal Infections)**, London: Elsevier, 2009. p. 223–234.

DE CLERCQ, K.; DE LEEUW, I.; VERHEYDEN, B.; VANDEMEULEBROUCKE, E.; VANBINST, T.; HERR, C.; MÉROC, E.; BERTELS, G.; STEURBAUT, N.; MIRY, C.; DE BLEECKER, K.; MAQUET, G.; BUGHIN, J.; SAULMONT, M.; LEBRUN, M.; SUSTRONCK, B.; DE DEKEN, R.; HOOYBERGHS, J.; HOUDART, P.; RAEMAEEKERS, M.; MINTIENS, K.; KERKHOF, P.; GORIS, N.; VANDENBUSSCHE, F. Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type Bluetongue virus serotype 8 natural infection. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, p. 352–359, 2008.

DU TOIT, R. M. The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 19, p. 7-16, 1944.

DUARTE, J. M. B. Artiodactyla – Cervidae (Veado-Catingueiro, Veado-Campeiro, Cervo-do-Pantanal), p.641-664. In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R., CATÃO-DIAS, J. L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007.

DUARTE, J. M. B.; ARITA, G. M. M. Ocorrência de doença hemorrágica em um plantel de *Mazama gouazoubira* (Veado catingueiro), possivelmente causado pelo vírus da língua azul e orbivírus relacionados. **XLVII Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária e 1º Encontro Nacional da ABRAVAS**. São Paulo, setembro de 1992.

DUARTE, J. M. B.; ARITA, G. M. M. Aspectos patológicos e epizootiológicos da doença hemorrágica causada por orbivírus em *Mazama gouazoubira*. In: Congresso Brasileiro e I Encontro Internacional da Sociedade de Zoológicos do Brasil. **Anais do Congresso Brasileiro e I Encontro Internacional da Sociedade de Zoológicos do Brasil**, Goiânia, 1993.

EAGLES, D.; DEVESON, T.; WALKER, P. J.; ZALUCKI, M. P.; DURR, P. Evaluation of long-distance dispersal of *Culicoides* midges into northern Australia using a migration model. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 334–340, 2012.

EAGLES, D.; WALKER, P. J.; ZALUCKI, M. P.; DURR, P. A. Modelling spatio-temporal patterns of long-distance *Culicoides* dispersal into northern Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 110, p. 312–322, 2013.

ELBERS, A. R. W.; BACKX, A.; MEROC, E.; GERBIER, G.; STAUBACH, C.; HENDRICKX, G.; VAN DER SPEK, A.; MINTIENS, K. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 21–30, 2008.

ERASMUS, B. J. Bluetongue in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 165-170, 1975.

ERASMUS, B. J.; POTGIETER, A. C. The history of bluetongue. In: MELLOR, P. S.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. P. C. **Bluetongue**, 1 ed. London: Academic Press, 2009. p. 7-21.

FAVERO, C. M.; MATOS, A. C. D.; CAMPOS, F. S.; CÂNDIDO, M. V.; COSTA, E. A.; HEINEMANN, M. B.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; LOBATO, Z. I. P. Epizootic Hemorrhagic Disease in Broomfield Deer, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19 (2), p. 346-348, 2013.

GAYDOS, J. K.; STALLKNECHT, D. E.; KAVANAUGH, D.; OLSON, R. J.; FUCHS, E. R. Dynamics of maternal antibodies to hemorrhagic disease viruses (Reoviridae: Orbivirus) in White-tailed deer. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38(2), p. 253-257, 2002.

GERDES, G. H. A South African overview of the virus, vectors, surveillance and unique features of bluetongue. **Veterinaria Italiana**, v. 40 (3), p. 39-42, 2004.

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

GOFFREDO, M.; MEISWINKEL, R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. **Veterinaria Italiana**, 40(3), p. 260-265, 2004.

GORSCH, C.; VAGNOZZI, A.; DUFFY, S.; MIQUET, J.; PACHECO, J.; BOLONDI, A.; DRAGHI, G.; CETRA, B.; SONI, C.; RONDEROS, M.; RUSSO, S.; RAMIREZ, V.; LAGER, I. Bluetongue: isolation and characterization of the virus and vector identification in the northeast of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 34, p. 150-156, 2002.

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

HAIGH, J. C.; MACKINTOSH, C.; GRIFFIN, F. Viral, parasitic and prion diseases of farmed deer and bison. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 21(2), p. 219-248, 2002.

HARDY, W. T.; PRICE, D. A. Soremuzzle of sheep. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 120, p. 23-25, 1952.

HASSAN, S. S.; ROY, P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. **Journal of Virology**, v. 73 (12), p. 9832-9842, 1999.

HASSAN, S. H.; WIRBLICH, C.; FORZAN, M.; ROY, P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization. **Journal of Virology**, v. 75 (18), p. 8356-8367, 2001.

HOFF, G.L.; TRAINER, D.O. Hemorrhagic diseases of wild ruminants. In: DAVIS, J.W.; KARSTAD, L.H.; TRAINER, D.O. (Eds). **Infectious diseases of wild mammals**, 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 1981, p. 45-53.

HOFMANN, M.; GRIOT, C.; CHAIGNAT, V.; PERLER, L.; THÜR, B. Bluetongue disease reaches Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 150, p. 49-56, 2008.

HOFMANN, M. A.; RENZULLO, S.; MADER, M.; CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; THUER, B. Genetic characterization of Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1855–1861, 2008.

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

HOWERTH, E. W.; STALLKNECHT, D. E.; KIRKLAND, P. D. Bluetongue, epizootic hemorrhagic disease, and other orbivirus-related diseases. In: WILLIAMS, E. S., BARKER, I. K. (Eds), **Infectious Diseases of Wild Mammals**, 3 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2001. p. 77-97.

HUTCHEON, D. Malarial catarrhal fever of sheep. **Veterinary Record**, v. 14, p. 629-633, 1902.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2016-1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 14 jul. 2016.

JENCKEL, M.; BRÉARD, E.; SCHULZ, C.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; HOFFMANN, B.; HÖPER, D.; BEER, M.; ZIENTARA, S.. Complete Coding Genome Sequence of Putative Novel Bluetongue Virus Serotype 27. **Genome Announcements**, v. 3 (2), e00016-15, 2015. doi:10.1128/genomeA.00016-15.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C., PALMER, N. **Pathology of domestic animals**, 4 ed., v. 2. San Diego: Academic Press, 1993. p. 173-175.

KATZ, J.; ALSTAD, D.; GUSTAFSON, G.; EVERMANN, J. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 139-142, 1994.

KAWANAMI, A. E. **Pesquisa de agentes virais de doenças hemorrágicas em cervídeos brasileiros: estudo retrospectivo**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.

KITCHING, R. P. Doenças causadas por vírus – Língua azul. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Medicina Bovina – Doenças e Criação de Bovinos**, 2 ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 608-610.

KUSILUKA, L.; KAMBARAGE, D. **Diseases of small ruminants in Sub-saharan Africa**. Scotland: Vetaid, 1996. p. 75.

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

LAGER, I. A.; DUFFY, S.; MIQUET, J.; VAGNOZZI, A.; GORCHS, C.; DRAGHI, M.; CETRÁ, B.; SONI, C.; HAMBLIN, C.; MAAN, S.; SAMUEL, A. R.; MERTENS, P. P. C.; RONDEROS, M.; RAMIREZ, V. Incidence and isolation of bluetongue virus infection in cattle of the Santo Tomé Department, Corrientes Province, Argentina. **Veterinaria Italiana**, v. 40 (3), p. 141-144, 2004.

LEE, F.; TING, L. J.; JONG, M. H.; CHANG, W. M.; WANG, F. I. Subclinical bluetongue virus infection in domestic ruminants in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 225–231, 2010.

LEGISA, D.; GONZALEZ, F.; DE STEFANO, G.; PEREDA, A.; DUS SANTOS, M. J. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 652-662, 2013.

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

LOBATO, Z. I. P. **Vírus da língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccínia e resposta imune**. 1996. Tese de Doutorado – UFMG, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1996.

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

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**, v. 51 (4), p. 253-262, 2015.

LÓPEZ-OLVERA, J. R.; FALCONI, C.; FERNÁNDEZ-PACHECO, P.; FERNÁNDEZ-PINERO, J.; SÁNCHEZ, M. A.; PALMA, A.; HERRUZO, I.; VICENTE, J.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M. A.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M.; GORTÁZAR, C. Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 148–152, 2010.

LORCA-ORÓ, C.; LÓPEZ-OLVERA, J. R.; RUIZ-FONS, F.; ACEVEDO, P.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; OLEAGA, A.; GORTÁZAR, C.; PUJOLS, J. Long-Term dynamics of Bluetongue virus in wild ruminants: relationship with outbreaks in livestock in Spain, 2006-2011. **PLoS ONE**, v. 9 (6), e100027, 2014.

LUEDKE, A. J.; JOCHIM, M. M.; BOWNE, J. G. Preliminary bluetongue transmission with the sheep ked *Melophagus ovinus* (L.). **Canadian Journal of Comparative Medical and Veterinary Science**, v. 29, p. 229–231, 1965.

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**, v. 44, p. 741–751, 2007.

MAAN, N. S.; MAAN, S.; BELAGANAHALLI, M. N.; OSTLUND, E. N.; JOHNSON, D. J.; NOMIKOU, K.; MERTENS, P. P. C. Identification and differentiation of the twenty-six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. **PLoS ONE**, v. 7, e32601, 2012.

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

MACLACHLAN, N. J. The changing global face of bluetongue: from the beginning. **Veterinaria Italiana**, v. 51 (4), p. 249-251, 2015.

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

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de Doenças de notificação obrigatória de 2014**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/0arquivos/a/IN%2050%20Lista%20DNO%20DOU%202013_09_25.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2014.

MATOS, A. C. D.; ROSA, J. C. C.; NOMIKOU, K.; GUIMARÃES, L. L. B.; COSTA, E. A.; GUEDES, M. I. M. C.; DRIEMEIER, D.; LOBATO, Z. I. P.; MERTENS, P. P. C. Genome Sequence of Bluetongue virus Serotype 17 Isolated in Brazil in 2014. **American Society for Microbiology, Genome Announcements**, v.4 (5), e01161-16, 2016.

MAYO, C. E.; CROSSLEY, B. M.; HIETALA, S. K.; GARDNER, I. A.; BREITMEYER, R. E.; MACLACHLAN, N. J. Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 277–281, 2010.

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

MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. *Culicoides* biting midges: their role as Arbovirus vectors. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 307–340, 2000.

MELLOR, P. S.; MERTENS, P. P. C.; BAYLIS, M. Conclusions. In: MELLOR, P. S.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. P. C. **Bluetongue**, 1 ed. London: Academic Press, 2009. p. 453-457.

MEISWINKEL, R.; NEVILL, E.M.; VENTER, G. J. Vectors: *Culicoides* spp. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa**, v. 1, Cape Town: Oxford University Press, 1994. pp. 68–89.

MICHELSSEN, P.G. Língua azul. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**, v. 1. São Paulo; Manole, 1990. p. 728-731.

MO, C. L.; THOMPSON, L. H.; HOMAN, E. J.; OVIEDO, M. T.; GREINER, E. C.; GONZÁLEZ, J.; SÁENZ, M. R. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerican Bluetongue Team. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55 (2), p. 211-215, 1994.

MONTASSIER, H. J.; PANDOLFI, J. R.; ARAÚJO JR., J. P.; DUARTE, J. M. B. Língua Azul (LA) e Doença Hemorrágica Epizootica dos Cervídeos (DHEC) em cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Estudo sorológico e identificação viral. In: DUARTE, J. M. B. **O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. (CD-ROM). Jaboticabal: Funep, 2001.

MORATO, R. G.; CATÃO DIAS, J. L.; ARITA, G. M. M. Ocorrência de doença hemorrágica em cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). In: Congresso Brasileiro e I Encontro Internacional da Sociedade de Zoológicos do Brasil. **Anais do Congresso Brasileiro e I Encontro Internacional da Sociedade de Zoológicos do Brasil**, Goiânia, 1993.

MULLENS, B. A.; TABACHNICK, W. J.; HOLBROOK, F. R.; THOMPSON, L. H. Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*. **Medical Veterinary Entomology**, v. 9, p. 71–76, 1995.

NASSON, E. L.; ROTHAGEL, R.; MUKHERJEE, S. K.; KAR, A. K.; FORZAN, M.; PRASAD, B. V. V.; ROY, P. Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. **Journal of Virology**, v. 78 (15), p. 8059–8067, 2004.

OIE. Office International des Épidémiologies. **Listed diseases 2016**. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>>. Acesso em: 20 maio 2016.

OIE 2014. Office International des Épidémiologies. **OIE Terrestrial Manual 2014. Bluetongue**. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUE Tong UE.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2016.

OIE 2016. **World Animal Health Information System**. Disponível em: <www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI/index/newlang/en> Acesso em: 28 jul. 2016.

OIE, 2016. Office International des Épidémiologies. **Infection with bluetongue virus**. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_bluetongue.pdf>. Acesso em: 10 out.2016.

OSBURN, B. I. Bluetongue. In: AITKEN, I. D. (Ed). **Diseases of the sheep**, 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 455-459, 2007.

OSTLUND, E. N. **Veterinary Services, Orbivirus Activities at NVSL**. U.S. Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services Science, Technology and Analysis Service, 2015. Disponível em:

<<http://www.usaha.org/Portals/6/2015%20%20BTV%20EHDV%20AHSV%20Ostlund.pdf>> Acesso: 18 out.2016.

PANDOLFI, J. R. C. **Língua azul e Doença Hemorrágica Epizootica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres.** 1999. 68 f. Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1999.

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

PAWESKA, J. T.; VENTER, G. J.; MELLOR, P. S. Vector competence of South African *Culicoides* species for bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. **Medical Veterinary Entomology**, v. 16, p. 10–21, 2002.

RATINIER, M.; CAPOALE, M.; GOLDER, M.; FRANZONI, G.; ALLAN, K.; NUNES, S. F.; ARMEZZANI, A.; BAYOUMY, A.; RIXON, F.; SHAW, A.; PALMARINI, M. Identification and Characterization of a Novel Non-Structural Protein of Bluetongue Virus. **PLoS Pathogens**, v. 7 (12), e1002477, 2011.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. Viral diseases to be differentiated from foot-and-mouth disease. **Ciência Rural**, v. 26 (2), p. 323-332, 1996.

RONDEROS, M.; GRECO, N.; SPINELLI, G. Diversity of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the area of the Yacyreta dam lake between Argentina and Paraguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98 (1), p. 19-24, 2003.

RUDER, M. G.; LYSYK, T. J.; STALLKNECHT, D. E.; FOIL, L. D.; JOHNSON, D. J.; CHASE, C. C.; DARGATZ, D. A.; GIBBS, E. P. J. Transmission and epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in north america: current perspectives, research gaps, and future directions. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 15 (6), p. 348-363, 2015.

RUSSELL, H.; O'TOOLE, D. T.; BARDSLEY, K.; DAVIS, W.C.; ELLIS, J. A. Comparative effects of bluetongue virus infection of ovine and bovine endothelial cells. **Veterinary Pathology**, v. 33 (3), p. 19-33, 1996.

SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B.; RISALDE, M. A.; MOLINA, V.; PEDRERA, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Immunohistochemical Detection of Bluetongue Virus in Fixed Tissue. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, p. 20-28, 2010.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P. P. C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BRÉARD, E.; MELLOR, P. S.; MACLACHLAN, N. J.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Veterinary Research**, v. 39 (5), p. 445-466, 2008.

SPREULL, J. Report from veterinary surgeon Spreull on the result of his experiments with the malarial catarrhal fever of sheep. **Agricultural Journal of Cape of Good Hope**, v. 20, p. 469-477, 1902.

SPREULL, J. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. **Journal of Comparative Pathology**, v. 18, p. 321-337, 1905.

ST GEORGE, T. D.; CYBINSKI, D. H.; DELLA-PORTA, A. J.; MCPHEE, D. A.; WARK, M. C.; BAINBRIDGE, M. H. The isolation of two bluetongue viruses from healthy cattle in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 562-563, 1980.

ST GEORGE, T. D.; STANDFAST, H. A.; CYBINSKI, D. H.; DYCE, A. L.; MULLER, M. J.; DOHERTY, R. L.; CARLEY, J. G.; FILIPPICH, C.; FRAZIER, C. L. The isolation of a bluetongue virus from *Culicoides* collected in the Northern Territory of Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 153-154, 1978.

STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W. Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. **Veterinaria Italiana**, v. 40, p. 203-207, 2004.

STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W.; GAYDOS, J. K. Hemorrhagic disease in white-tailed deer: our current understanding of risk. **Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference**, v. 67, p. 75-86, 2002.

STOTT, J.L. Reoviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. (Eds). **Veterinary Microbiology**. Massachusetts: Blackwell Science, 1999, p. 430-438.

STOTT, J. L.; OSBURN, B. I.; ALEXANDER, L. *Ornithodoros coriaceus* (pajaroello tick) as a vector of bluetongue virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46 (5), p. 1197-1199, 1985.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P. P. C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BRÉARD, E.; MELLOR, P. S.; MACLACHLAN, N. J.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Veterinary Research**, v. 39, 2008.

TABACHNICK, W. J. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. **Veterinaria Italiana**, v. 40, p. 145–150, 2004.

TABACHNICK, W. J. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epizootics in a changing world. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 946–954, 2010.

TAYLOR, W. P. The epidemiology of bluetongue. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v.5, p. 351-356, 1986.

THORNE, E. T. Bluetongue. In: THORNE, E. T.; KINGSTON, N.; JOLLEY, W. R.; BERGSTROM, R. C. (Eds). **Diseases of Wildlife in Wyoming**. Wyoming Game and Fish Department, Laramie, 5-9, 1982.

TING, L. J.; LEE, M. S.; HUANG, T. S.; HUANG, C. C.; KUO, S. T.; LEE, F.; JONG, M. H.; SHIAU, J. R.; LIN, S. Y. Identification of bluetongue virus in goats in Taiwan. **Veterinary Record**, v. 156 (2), p. 52, 2005.

VIAROUGE, C.; LANCELOT, R.; RIVES, G.; BRÉARD, E.; MILLER, M.; BAUDRIMONT, X.; DOCEUL, V.; VITOUR, D.; ZIENTARA, S.; SAILLEAU C. Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. **Veterinary Microbiology**, v. 174, p. 78–85, 2014.

ZIENTARA, S.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; HÖPER, D.; BEER, M.; JENCKEL, M.; HOFFMANN, B.; ROMEY, A.; BAKKALI-KASSIMI, L.; FABLET, A.; VITOUR, D.; BRÉARD, E. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 2123–2132, 2014.

WITTMANN, E. J., MELLOR, P. S.; BAYLIS, M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. **Medical Veterinary Entomology**, v. 16, p. 147–156, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de bovinos do Setor de Digestibilidade (B1 a B60), Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (B61 a B96) e Setor de Gado de Leite (B97 a B132).

ANIMAL	Nº LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	Nº LVB	Data da coleta
B1	8890	R	R	neg	16071	04/02/15
B2	8891	R	R	neg	16072	04/02/15
B3	8892	R	R	neg	16073	04/02/15
B4	8893	R	R	neg	16074	04/02/15
B5	8894	R	R	neg	16075	04/02/15
B6	8895	R	R	neg	16076	04/02/15
B7	8896	R	R	neg	16077	04/02/15
B8	8897	R	R	neg	16078	04/02/15
B9	8898	R	R	neg	16079	04/02/15
B10	8899	R	R	neg	16080	04/02/15
B11	8900	R	R	neg	16081	04/02/15
B12	8901	R	R	neg	16082	04/02/15
B13	8902	R	R	neg	16083	04/02/15
B14	8903	R	R	neg	16084	04/02/15
B15	8904	R	R	neg	16085	04/02/15
B16	8905	R	R	neg	16086	04/02/15
B17	8906	R	R	neg	16087	04/02/15
B18	8907	R	R	neg	16088	04/02/15
B19	8908	R	R	neg	16089	04/02/15
B20	8909	R	R	neg	16090	04/02/15
B21	8910	R	R	neg	16091	04/02/15
B22	8911	R	R	neg	16092	04/02/15
B23	8912	R	R	neg	16093	04/02/15
B24	8913	R	R	neg	16094	04/02/15
B25	8914	R	R	neg	16095	04/02/15
B26	8915	R	R	neg	16096	04/02/15
B27	8916	R	R	neg	16097	04/02/15
B28	8917	R	R	neg	16098	04/02/15
B29	8918	R	R	neg	16099	04/02/15
B30	8919	R	R	neg	16100	04/02/15
B31	8920	R	R	neg	16101	04/02/15
B32	8921	R	R	neg	16102	04/02/15
B33	8922	R	R	neg	16103	04/02/15
B34	8923	R	R	neg	16104	04/02/15
B35	8924	R	R	neg	16105	04/02/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
B36	8925	R	R	neg	16106	04/02/15
B37	8926	R	R	neg	16107	04/02/15
B38	8927	R	R	neg	16108	04/02/15
B39	8928	R	R	neg	16109	04/02/15
B40	8929	R	R	neg	16110	04/02/15
B41	8930	R	R	neg	16111	04/02/15
B42	8931	R	R	neg	16112	04/02/15
B43	8932	R	R	neg	16113	04/02/15
B44	8933	R	R	neg	16114	04/02/15
B45	8934	R	R	neg	16115	04/02/15
B46	8935	R	R	neg	16116	04/02/15
B47	8936	R	R	neg	16117	04/02/15
B48	8937	R	R	neg	16118	04/02/15
B49	8938	R	R	neg	16119	04/02/15
B50	8939	R	R	neg	16120	04/02/15
B51	8940	R	R	neg	16121	04/02/15
B52	8941	R	R	neg	16122	04/02/15
B53	8942	R	R	neg	16123	04/02/15
B54	8943	R	R	neg	16124	04/02/15
B55	8944	R	R	neg	16125	04/02/15
B56	8945	R	R	neg	16126	04/02/15
B57	8946	R	R	neg	16127	04/02/15
B58	8947	R	R	neg	16128	04/02/15
B59	8948	R	R	neg	16129	04/02/15
B60	8949	R	R	neg	16130	04/02/15
B61	8950	NR	NR	neg	16131	03/06/15
B62	8951	NR	NR	neg	16132	03/06/15
B63	8952	R	R	neg	16133	03/06/15
B64	8953	R	R	neg	16134	03/06/15
B65	8954	R	R	neg	16135	03/06/15
B66	8955	R	R	neg	16136	03/06/15
B67	8956	NR	NR	neg	16137	03/06/15
B68	8957	R	R	neg	16138	03/06/15
B69	8958	NR	NR	neg	16139	03/06/15
B70	8959	R	R	neg	16140	03/06/15
B71	8960	R	R	neg	16141	03/06/15
B72	8961	R	R	neg	16142	03/06/15
B73	8962	R	R	neg	16143	03/06/15
B74	8963	R	R	neg	16144	03/06/15
B75	8964	R	R	neg	16145	03/06/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
B76	8965	NR	R	neg	16146	03/06/15
B77	8966	R	R	neg	16147	03/06/15
B78	8967	R	R	neg	16148	03/06/15
B79	8968	R	R	neg	16149	03/06/15
B80	8969	NR	NR	neg	16150	03/06/15
B81	8970	NR	NR	neg	16151	03/06/15
B82	8971	R	R	neg	16152	03/06/15
B83	8972	R	R	neg	16153	03/06/15
B84	8973	R	R	neg	16154	03/06/15
B85	8974	R	R	neg	16155	03/06/15
B86	8975	NR	R	neg	16156	03/06/15
B87	8976	NR	NR	neg	16157	03/06/15
B88	8977	NR	NR	neg	16158	03/06/15
B89	8978	R	R	neg	16159	03/06/15
B90	8979	NR	R	neg	16160	03/06/15
B91	8980	R	R	neg	16161	03/06/15
B92	8981	R	R	neg	16162	03/06/15
B93	8982	R	R	neg	16163	03/06/15
B94	8983	R	R	neg	16164	03/06/15
B95	8984	R	R	pos	16165	03/06/15
B96	8985	R	R	neg	16166	03/06/15
B97	8986	R	R	neg	16167	09/06/15
B98	8987	R	R	neg	16168	09/06/15
B99	8988	R	R	neg	16169	09/06/15
B100	8989	R	R	neg	16170	09/06/15
B101	8990	R	R	neg	16171	09/06/15
B102	8991	R	R	neg	16172	09/06/15
B103	8992	R	R	neg	16173	09/06/15
B104	8993	R	R	neg	16174	09/06/15
B105	8994	R	R	neg	16175	09/06/15
B106	8995	R	R	neg	16176	09/06/15
B107	8996	R	R	neg	16177	09/06/15
B108	8997	R	R	neg	16178	09/06/15
B109	8998	R	R	neg	16179	09/06/15
B110	8999	R	R	neg	16180	09/06/15
B111	9000	R	R	neg	16181	09/06/15
B112	9001	R	R	neg	16182	09/06/15
B113	9002	R	R	neg	16183	09/06/15
B114	9003	R	R	neg	16184	09/06/15
B115	9004	R	R	neg	16185	09/06/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
B116	9005	R	R	neg	16186	09/06/15
B117	9006	NR	NR	neg	16187	09/06/15
B118	9007	R	R	neg	16188	09/06/15
B119	9008	R	R	neg	16189	09/06/15
B120	9009	R	R	neg	16190	09/06/15
B121	9010	R	R	neg	16191	09/06/15
B122	9011	R	R	neg	16192	09/06/15
B123	9012	R	R	neg	16193	09/06/15
B124	9013	R	R	neg	16194	09/06/15
B125	9014	R	R	neg	16195	09/06/15
B126	9015	R	R	neg	16196	09/06/15
B127	9016	R	R	neg	16197	09/06/15
B128	9017	R	R	neg	16198	09/06/15
B129	9018	R	R	neg	16199	09/06/15
B130	9019	R	R	neg	16200	09/06/15
B131	9020	R	R	neg	16201	09/06/15
B132	9021	R	R	neg	16202	09/06/15

R = reagente; NR = não reagente; neg = negativo; pos = positivo

APÊNDICE B. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de ovinos do Hospital Veterinário (Ov1 a Ov27), Setor de Bioclimatologia (Ov28 a Ov46), Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos (Ov46 a Ov59), Setor de Ovinocultura (Ov60 a Ov96), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (Ov97 a Ov116) e propriedade particular (Ov117 a Ov174).

ANIMAL	Nº LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	Nº LVB	Data da coleta
Ov 1	9023	NR	NR	neg	16203	28/01/15
Ov 2	9024	NR	NR	neg	16204	28/01/15
Ov 3	9025	R	R	neg	16205	28/01/15
Ov 4	9026	NR	NR	neg	16206	28/01/15
Ov 5	9027	NR	R	neg	16207	28/01/15
Ov 6	9028	R	R	neg	16208	28/01/15
Ov 7	9029	R	R	neg	16209	28/01/15
Ov 8	9030	NR	NR	neg	16210	28/01/15
Ov 9	9031	NR	NR	neg	16211	28/01/15
Ov 10	9032	NR	R	neg	16212	28/01/15
Ov 11	9033	NR	NR	neg	16213	28/01/15
Ov 12	9034	NR	R	neg	16214	28/01/15
Ov 13	9035	R	R	neg	16215	28/01/15
Ov 14	9036	R	R	neg	16216	28/01/15
Ov 15	9037	NR	NR	neg	16217	28/01/15
Ov 16	9038	NR	NR	neg	16218	28/01/15
Ov 17	9039	R	R	neg	16219	28/01/15
Ov 18	9040	R	R	neg	16220	28/01/15
Ov 19	9041	NR	NR	neg	16221	28/01/15
Ov 20	9042	NR	NR	neg	16222	28/01/15
Ov 21	9043	R	R	neg	16223	28/01/15
Ov 22	9044	NR	NR	neg	16224	28/01/15
Ov 23	9045	NR	NR	neg	16225	28/01/15
Ov 24	9046	NR	NR	neg	16226	28/01/15
Ov 25	9047	NR	NR	neg	16227	28/01/15
Ov 26	9048	R	R	neg	16228	28/01/15
Ov 27	9049	R	R	neg	16229	28/01/15
Ov 28	9051	NR	NR	neg	16231	03/02/15
Ov 29	9052	NR	NR	neg	16232	03/02/15
Ov 30	9053	NR	NR	neg	16233	03/02/15
Ov 31	9054	R	R	neg	16234	03/02/15
Ov 32	9055	NR	NR	neg	16235	03/02/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
Ov 33	9056	NR	NR	neg	16236	03/02/15
Ov 34	9057	NR	NR	neg	16237	03/02/15
Ov 35	9058	NR	NR	neg	16238	03/02/15
Ov 36	9059	NR	NR	neg	16239	03/02/15
Ov 37	9060	NR	NR	neg	16240	03/02/15
Ov 38	9061	NR	NR	neg	16241	03/02/15
Ov 39	9062	NR	NR	neg	16242	03/02/15
Ov 40	9063	NR	NR	neg	16243	03/02/15
Ov 41	9064	NR	NR	neg	16244	03/02/15
Ov 42	9065	NR	NR	neg	16245	03/02/15
Ov 43	9066	NR	NR	neg	16246	03/02/15
Ov 44	9067	NR	NR	neg	16247	03/02/15
Ov 45	9068	NR	NR	neg	16248	03/02/15
Ov 46	9069	NR	NR	neg	16249	03/02/15
Ov 47	9070	NR	NR	neg	16250	05/02/15
Ov 48	9071	NR	NR	neg	16251	05/02/15
Ov 49	9072	NR	NR	neg	16252	05/02/15
Ov 50	9073	NR	NR	neg	16253	05/02/15
Ov 51	9074	NR	NR	neg	16254	05/02/15
Ov 52	9075	NR	NR	neg	16255	05/02/15
Ov 53	9076	NR	NR	neg	16256	05/02/15
Ov 54	9077	NR	NR	neg	16257	05/02/15
Ov 55	9078	NR	NR	neg	16258	05/02/15
Ov 56	9079	NR	NR	neg	16259	05/02/15
Ov 57	9080	NR	NR	neg	16260	05/02/15
Ov 58	9081	NR	NR	neg	16261	05/02/15
Ov 59	9082	R	R	neg	16262	05/02/15
Ov 60	9083	R	R	neg	16263	12/06/15
Ov 61	9084	R	R	neg	16264	12/06/15
Ov 62	9085	R	R	neg	16265	12/06/15
Ov 63	9086	R	R	neg	16266	12/06/15
Ov 64	9087	NR	R	neg	16267	12/06/15
Ov 65	9088	R	R	neg	16268	12/06/15
Ov 66	9089	NR	NR	neg	16269	12/06/15
Ov 67	9090	R	R	neg	16270	12/06/15
Ov 68	9091	NR	NR	neg	16271	12/06/15
Ov 69	9092	R	R	neg	16272	12/06/15
Ov 70	9093	R	R	neg	16273	12/06/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
Ov 71	9094	R	R	neg	16274	12/06/15
Ov 72	9095	R	R	neg	16275	12/06/15
Ov 73	9096	R	R	neg	16276	12/06/15
Ov 74	9097	R	R	--	--	12/06/15
Ov 75	9098	R	R	neg	16277	12/06/15
Ov 76	9099	R	R	neg	16278	12/06/15
Ov 77	9100	R	R	neg	16279	12/06/15
Ov 78	9101	R	R	--	--	12/06/15
Ov 79	9102	R	R	pos	16280	12/06/15
Ov 80	9103	R	R	neg	16281	12/06/15
Ov 81	9104	R	R	neg	16282	12/06/15
Ov 82	9105	R	R	neg	16283	12/06/15
Ov 83	9106	R	R	neg	16284	12/06/15
Ov 84	9107	R	R	neg	16285	12/06/15
Ov 85	9108	R	R	neg	16286	12/06/15
Ov 86	9109	R	R	neg	16287	12/06/15
Ov 87	9110	R	R	neg	16288	12/06/15
Ov 88	9111	R	R	pos	16289	12/06/15
Ov 89	9112	R	R	pos	16290	12/06/15
Ov 90	9113	NR	NR	--	--	12/06/15
Ov 91	9114	NR	R	pos	16291	12/06/15
Ov 92	9115	NR	NR	neg	16292	12/06/15
Ov 93	9116	R	R	neg	16293	12/06/15
Ov 94	9117	R	R	neg	16294	12/06/15
Ov 95	9118	R	R	neg	16295	12/06/15
Ov 96	9119	R	R	pos	16296	12/06/15
Ov 97	9120	R	R	neg	16297	18/06/15
Ov 98	9121	R	R	neg	16298	18/06/15
Ov 99	9122	R	R	neg	16299	18/06/15
Ov 100	9123	R	R	pos	16300	18/06/15
Ov 101	9124	NR	NR	neg	16301	18/06/15
Ov 102	9125	R	R	neg	16302	18/06/15
Ov 103	9126	NR	R	neg	16303	18/06/15
Ov 104	9127	R	R	neg	16304	18/06/15
Ov 105	9128	NR	NR	neg	16305	18/06/15
Ov 106	9129	NR	NR	neg	16306	18/06/15
Ov 107	9130	NR	NR	neg	16307	18/06/15
Ov 108	9131	R	R	neg	16308	18/06/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
Ov 109	9132	R	R	neg	16309	18/06/15
Ov 110	9133	R	R	pos	16310	18/06/15
Ov 111	9134	R	R	neg	16311	18/06/15
Ov 112	9135	R	R	neg	16312	18/06/15
Ov 113	9136	R	R	pos	16313	18/06/15
Ov 114	9137	R	R	neg	16314	18/06/15
Ov 115	9138	R	R	pos	16315	18/06/15
Ov 116	9139	NR	R	neg	16316	18/06/15
Ov 117	11452	R	R	neg	11510	19/04/14
Ov 118	11453	R	R	neg	11511	19/04/14
Ov 119	11454	R	R	neg	11512	19/04/14
Ov 120	11455	R	R	neg	11513	19/04/14
Ov 121	11456	R	R	neg	11514	19/04/14
Ov 122	11457	R	R	neg	11515	19/04/14
Ov 123	11458	R	R	neg	11516	19/04/14
Ov 124	11459	R	R	neg	11517	19/04/14
Ov 125	11460	R	R	neg	11518	19/04/14
Ov 126	11461	R	R	neg	11519	19/04/14
Ov 127	11462	R	R	pos	11520	19/04/14
Ov 128	11463	R	R	pos	11521	19/04/14
Ov 129	11464	R	R	neg	11522	19/04/14
Ov 130	11465	NR	NR	neg	11523	19/04/14
Ov 131	11466	R	R	pos	11524	19/04/14
Ov 132	11467	R	R	neg	11525	19/04/14
Ov 133	11468	NR	NR	neg	11526	19/04/14
Ov 134	11469	R	R	neg	11527	19/04/14
Ov 135	11470	R	R	pos	11528	19/04/14
Ov 136	11471	R	R	neg	11529	19/04/14
Ov 137	11472	R	R	neg	11530	19/04/14
Ov 138	11473	R	R	neg	11531	19/04/14
Ov 139	11474	R	R	neg	11532	19/04/14
Ov 140	11475	R	R	neg	11533	19/04/14
Ov 141	11476	R	R	pos	11534	19/04/14
Ov 142	11477	R	R	pos	11535	19/04/14
Ov 143	11478	R	R	pos	11536	19/04/14
Ov 144	11479	NR	NR	neg	11537	19/04/14
Ov 145	11480	R	R	neg	11538	19/04/14

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
Ov 146	11481	R	R	neg	11539	19/04/14
Ov 147	11482	R	R	neg	11540	19/04/14
Ov 148	11483	R	R	neg	11541	19/04/14
Ov 149	11484	R	R	pos	11542	19/04/14
Ov 150	11485	R	R	neg	11543	19/04/14
Ov 151	11486	R	R	neg	11544	19/04/14
Ov 152	11487	R	R	neg	11545	19/04/14
Ov 153	11488	NR	NR	neg	11546	19/04/14
Ov 154	11489	R	R	neg	11547	19/04/14
Ov 155	11490	R	R	neg	11548	19/04/14
Ov 156	11491	NR	NR	neg	11549	19/04/14
Ov 157	11492	NR	NR	neg	11550	19/04/14
Ov 158	11493	NR	NR	neg	11551	19/04/14
Ov 159	11494	NR	NR	neg	11552	19/04/14
Ov 160	11495	NR	NR	neg	11553	19/04/14
Ov 161	11496	R	R	neg	11554	19/04/14
Ov 162	11497	NR	R	pos	11555	19/04/14
Ov 163	11498	NR	NR	neg	11556	19/04/14
Ov 164	11499	NR	NR	neg	11557	19/04/14
Ov 165	11500	NR	R	neg	11558	19/04/14
Ov 166	11501	NR	NR	neg	11559	19/04/14
Ov 167	11502	R	R	neg	11560	19/04/14
Ov 168	11503	NR	NR	--	--	19/04/14
Ov 169	11504	R	R	neg	11562	19/04/14
Ov 170	11505	NR	NR	neg	11563	19/04/14
Ov 171	11506	R	R	neg	11564	19/04/14
Ov 172	11507	NR	NR	neg	11565	19/04/14
Ov 173	11508	NR	NR	neg	11566	19/04/14
Ov 174	11509	R	R	neg	11567	19/04/14

R = reagente; NR = não reagente; neg = negativo; pos = positivo; -- = sem amostra

APÊNDICE C. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de caprinos do Setor de Caprinocultura (Cap1 a Cap42), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (Cap43 a Cap 45) e Hospital Veterinário (Cap46).

ANIMAL	Nº LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	Nº LVB	Data da coleta
Cap 1	9140	NR	NR	neg	16317	11/06/15
Cap 2	9141	NR	NR	neg	16318	11/06/15
Cap 3	9142	NR	NR	neg	16319	11/06/15
Cap 4	9143	NR	NR	neg	16320	11/06/15
Cap 5	9144	NR	NR	neg	16321	11/06/15
Cap 6	9145	NR	NR	neg	16322	11/06/15
Cap 7	9146	NR	NR	neg	16323	11/06/15
Cap 8	9147	NR	NR	neg	16324	11/06/15
Cap 9	9148	NR	NR	neg	16325	11/06/15
Cap 10	9149	NR	NR	neg	16326	11/06/15
Cap 11	9150	NR	NR	neg	16327	11/06/15
Cap 12	9151	NR	NR	neg	16328	11/06/15
Cap 13	9152	NR	NR	neg	16329	11/06/15
Cap 14	9153	NR	NR	neg	16330	11/06/15
Cap 15	9154	NR	NR	neg	16331	11/06/15
Cap 16	9155	NR	NR	neg	16332	11/06/15
Cap 17	9156	NR	NR	neg	16333	11/06/15
Cap 18	9157	NR	NR	--	--	11/06/15
Cap 19	9158	NR	NR	--	--	11/06/15
Cap 20	9159	NR	NR	neg	16334	11/06/15
Cap 21	9160	NR	NR	neg	16335	11/06/15
Cap 22	9161	NR	NR	neg	16336	11/06/15
Cap 23	9162	NR	R	neg	16337	11/06/15
Cap 24	9163	NR	NR	neg	16338	11/06/15
Cap 25	9164	NR	NR	pos	16339	11/06/15
Cap 26	9165	NR	NR	neg	16340	11/06/15
Cap 27	9166	R	R	neg	16341	11/06/15
Cap 28	9167	NR	NR	neg	16342	11/06/15
Cap 29	9168	R	R	neg	16343	11/06/15
Cap 30	9169	NR	NR	neg	16344	11/06/15
Cap 31	9170	NR	NR	neg	16345	11/06/15
Cap 32	9171	NR	NR	neg	16346	11/06/15
Cap 33	9172	R	R	pos	16347	11/06/15
Cap 34	9173	NR	NR	pos	16348	11/06/15
Cap 35	9174	R	R	pos	16349	11/06/15

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta
Cap 36	9175	NR	NR	neg	16350	11/06/15
Cap 37	9176	NR	NR	neg	16351	11/06/15
Cap 38	9177	R	R	neg	16352	11/06/15
Cap 39	9178	R	R	neg	16353	11/06/15
Cap 40	9179	NR	NR	neg	16354	11/06/15
Cap 41	9180	NR	NR	neg	16355	11/06/15
Cap 42	9181	NR	NR	neg	16356	11/06/15
Cap 43	9182	R	R	neg	16357	18/06/15
Cap 44	9183	R	R	neg	16358	18/06/15
Cap 45	9184	NR	R	neg	16359	18/06/15
Cap 46	9050	R	R	neg	16230	28/01/15

R = reagente; NR = não reagente; neg = negativo; pos = positivo; -- = sem amostra

APÊNDICE

D. Resultados dos exames IDGA, ELISA e RT-qPCR realizados a partir de sangue colhido de cervídeos do NUPECCE.

ANIMAL	Nº LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	Nº LVB	Data da coleta	Espécie	Idade
Tessália T346	1513	R	NR	neg	30283	25/03/13	<i>M. nemorivaga</i>	Adulto
Theo T265	1514	R	NR	neg	30258	25/03/13	<i>M. nemorivaga</i>	Adulto
Wilson	1515	NR	NR	neg	30269	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Duda	1516	NR	NR	neg	30264	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Cleo	1517	NR	NR	neg	30282	26/03/13	<i>M. nemorivaga</i>	Adulto
Ice	1518	NR	NR	neg	30284	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Caixote	1519	NR	NR	neg	30281	26/03/13	<i>M. nemorivaga</i>	Adulto
Diogo	1520	NR	NR	neg	30262	26/03/13	<i>M. nana</i>	Adulto
Pici	1521	NR	NR	neg	30268	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Joseph Cat Fap 03	1522	R	NR	neg	30272	26/02/13	Híbrido*	Jovem
Piauí	1523	R	R	neg	30266	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Brisa	1524	R	NR	neg	30303	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Sensato	1525	R	NR	neg	30261	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Fauna	1526	NR	NR	neg	30280	26/03/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Bill Cat Fap 02	1527	R	NR	neg	30296	26/02/13	<i>M. gouazoubira</i>	Jovem
Wanderley	1528	R	R	neg	30291	12/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Chico	1529	R	NR	neg	30260	09/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Ventania	1530	NR	NR	neg	30279	09/04/13	<i>M. gouazoubira</i>	Jovem
Ney	1531	R	R	neg	30286	09/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Demi Moore	1532	NR	R	neg	30293	28/05/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Renner	1533	R	R	pos	30290	12/04/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta	Espécie	Idade
Pedro	1534	R	R	neg	30288	12/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Caique	1535	R	R	neg	30295	23/05/13	Sem dado	Sem dado
Bacon T347	1536	NR	NR	neg	30294	25/04/13	<i>M. americana</i>	Jovem
Gabi	1537	NR	NR	neg	30274	11/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Senna	1538	NR	NR	neg	30276	11/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Clara	1539	R	R	pos	30292	12/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Bitá	1540	R	R	neg	30271	11/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Pampo	1541	R	R	neg	30270	28/05/13	<i>O. bezoarticus</i>	Adulto
Natália	1542	NR	NR	neg	30285	10/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Paula	1543	R	R	pos	30304	10/04/13	<i>M. bororo</i>	Adulto
Luciana	1544	NR	NR	neg	30275	11/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Ricardo	1545	NR	NR	neg	30263	11/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Bolsonaro	1546	R	R	pos	30273	28/05/13	<i>O. virginianus</i>	Adulto
Tatiane	1547	R	R	pos	30267	09/04/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Aladim	1548	R	R	neg	30287	10/04/13	<i>M. americana</i>	Adulto
John	1549	NR	NR	neg	30289	10/04/13	<i>M. bororo</i>	Adulto
Dunga	1550	NR	NR	neg	30301	22/07/13	<i>M. americana</i>	Adulto
General	1551	NR	NR	neg	30299	25/07/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Guta	1552	NR	NR	neg	30300	06/06/13	<i>M. americana</i>	Jovem
Marquinhos	1553	NR	NR	pos	30265	29/05/13	<i>M. americana</i>	Jovem
Giovane	1554	R	NR	neg	30259	02/10/13	<i>M. nemorivaga</i>	Filhote
Theo T265	1555	NR	NR	neg	30277	11/10/13	<i>M. nemorivaga</i>	Adulto
Bill Cat Fap 02	1556	NR	NR	neg	30296	03/09/13	<i>M. gouazoubira</i>	Jovem

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta	Espécie	Idade
Neymar	1557	NR	NR	neg	1575	18/12/13	Híbrido*	Filhote
Nazira	1558	NR	NR	neg	30278	08/10/13	<i>M. gouazoubira</i>	Jovem
Joseph Cat Fap 03	1559	NR	NR	neg	30272	03/09/13	<i>M. gouazoubira</i>	Jovem
Palomina	1560	NR	NR	neg	30297	29/07/13	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Paçoca	1561	R	R	neg	30302	25/07/13	<i>M. americana</i>	Adulto
Bacon T347	1562	R	R	neg	30298	27/06/14	<i>M. americana</i>	Adulto
Ventania	1563	R	R	pos	1574	07/01/14	<i>M. gouazoubira</i>	Jovem
Juan	11578	NR	NR	neg	11568	25/02/14	<i>M. gouazoubira</i>	Filhote
Pinga	11579	NR	NR	neg	11569	04/02/14	<i>M. gouazoubira</i>	Filhote
Felix Cervo BR324	11580	R	R	neg	11570	14/01/13	<i>B. dichotomus</i>	Filhote
M.Joaquina	11581	R	R	neg	11571	13/02/14	<i>M. nemorivaga</i>	Adulto
Hulk	11582	NR	NR	neg	11572	22/01/14	<i>M. americana</i>	Filhote
Madiba	11583	NR	NR	neg	11573	30/06/14	<i>M. americana</i>	Filhote
Piquet	11584	R	R	neg	11574	21/03/14	<i>B. dichotomus</i>	Adulto
Belinha	11585	R	R	neg	11575	16/04/14	<i>B. dichotomus</i>	Adulto
Rosa	11586	NR	NR	neg	11576	30/06/14	<i>M. americana</i>	Jovem
Sandra	11587	R	R	neg	11577	24/04/14	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Ice	9022	NR	NR	neg	19768	10/02/15	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Cervo 513	--	--	--	neg	16360	--	<i>B. dichotomus</i>	Adulto
Edu 357	16367	NR	NR	neg	16361	13/01/15	<i>M. americana</i>	jovem
Chiquinho	16368	NR	NR	neg	16362	09/01/15	<i>M. gouazoubira</i>	Adulto
Malala	--	--	--	neg	16363	--	<i>M. americana</i>	Jovem

Continua

ANIMAL	N° LVB	IDGA	ELISA	RT PCR	N° LVB	Data da coleta	Espécie	Idade
Bacon	16369	NR	NR	neg	16364	16/01/15	<i>M. americana</i>	Adulto
Ellen	16370	NR	NR	neg	16365	13/01/15	<i>M. americana</i>	Jovem
Alladin	16371	NR	NR	neg	16366	12/01/15	<i>M. americana</i>	Adulto

R = reagente; NR = não reagente; neg = negativo; pos = positivo; -- = sem amostra. * = híbrido de *M. gouazoubira* x *M. nemorivaga*

APÊNDICE E. Número de insetos das famílias Ceratopogonidae, Psychodidae e Simuliidae colhidos nas diferentes épocas do ano de 2014 a 2016, em armadilhas luminosas montadas no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE, Jaboticabal - SP.

Data	Ceratopogonidae	Psychodidae	Simuliidae
28.12.14	9	0	5
29.12.14	29	2	14
03.01.15	2	0	0
04.01.15	6	0	1
05.01.15	3	3	0
06.01.15	9	2	1
07.01.15	2	0	0
08.01.15	2	0	0
11.01.15	6	0	4
12.01.15	16	0	1
13.01.15	21	3	3
14.01.15	9	2	2
15.01.15	12	0	4
17.01.15	4	0	4
18.01.15	21	0	3
19.01.15	10	0	8
20.01.15	26	0	9
21.01.15	4	2	3
23.01.15	2	1	0
24.01.15	15	1	0
25.01.15	1	0	0
26.01.15	2	1	11
27.01.15	4	1	1
28.01.15	5	0	0
29.01.15	3	0	2
31.01.15	14	1	1
02.02.15	4	0	0
04.02.15	3	1	0
07.02.15	10	4	0
09.02.15	0	0	0
11.02.15	10	0	2
16.02.15	9	0	0
17.02.15	7	1	3
13.03.15	9	2	0
13.06.15	18	29	0
26.06.15	4	3	0

Continua

Data	Ceratopogonidae	Psychodidae	Simuliidae
02.07.15	8	24	0
15.07.15	3	68	0
22.07.15	16	69	0
29.07.15	22	55	0
05.08.15	0	64	0
11.08.15	2	13	0
21.08.15	11	1	1
01.09.15	5	1	0
13.09.15	1	3	1
17.09.15	2	0	0
27.09.15	13	1	0
11.10.15	22	6	0
20.10.15	53	1	0
27.10.15	23	4	0
04.11.15	24	3	1
16.11.15	13	1	0
04.12.15	5	0	0
06.12.15	15	0	1
10.12.15	0	5	0
14.12.15	14	1	0
15.12.15	13	0	0
18.12.15	21	6	0
19.12.15	25	2	0
21.12.15	35	2	0
28.12.15	14	0	3
04.01.16	11	17	0
05.01.16	3	8	0
06.01.16	17	7	0
07.01.16	22	10	0
21.01.16	31	6	0
25.01.16	3	4	1