

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PESQUISA DE AGENTES VIRAIS DE DOENÇAS
HEMORRÁGICAS EM CERVÍDEOS BRASILEIROS: ESTUDO
RETROSPECTIVO

Aline Eyko Kawanami

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PESQUISA DE AGENTES VIRAIS DE DOENÇAS
HEMORRÁGICAS EM CERVÍDEOS BRASILEIROS: ESTUDO
RETROSPECTIVO

Aline Eyko Kawanami

Orientadora: Profa. Dra. Karin Werther

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

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 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal, com ingresso em março de 2003 e término em dezembro de 2007. Fez Residência na área de Medicina Veterinária de Animais Silvestres na Universidade Federal de Goiás durante o ano de 2009. Em março de 2010 ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível mestrado, área de concentração em Patologia Animal pela FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

“Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele. A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem nosso respeito e nossa proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles.”

Philip Ochoa

Dedico

Aos meus pais, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo exemplo de pessoas nas quais sempre me espelho e por sempre acreditarem na minha capacidade.

À minha avó Hama Kawanami, cujo caráter e conselhos tiveram grande influência na minha formação.

Às minhas irmãs, Tatiana, Stephanie e Amanda, pela amizade, companheirismo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas pessoas especiais que tenho encontrado ao longo da minha caminhada, me faz ter a certeza de que sou abençoada. Apesar de em alguns momentos ou situações difíceis com as quais me deparo, eu muitas vezes não entenda e até questione Sua existência, sei que há, na verdade, uma razão. Tudo acontece no momento certo e porque tem que acontecer.

Agradeço à minha família, o alicerce da minha vida. Obrigada aos meus pais Maria Kawanami e Yoshiaki Kawanami por terem passado valores que me ensinaram a ser quem sou hoje. Obrigada pelo incentivo, apoio, pela paciência e amor, vocês são meus exemplos de caráter e determinação. À minha avó Hama Kawanami, por eu ter tido a sorte de poder crescer ao seu lado e aprender o verdadeiro significado da palavra família. Às minhas irmãs Tatiana, Stephanie e Amanda pela amizade e por saber que sempre poderei contar com o apoio de vocês e vocês com o meu. Obrigada tia Kimiko, minha “segunda mãe”, pelo carinho sempre dedicado não só a mim como a todos os seus sobrinhos, tens um coração enorme. Agradeço a todos os meus tios, tias, primos e primas por sempre entenderem minha ausência em alguns momentos especiais e ainda assim lembrarem-se de mim.

Ao Felipe Barros, meu namorado, por fazer parte da minha vida e ajudar no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela paciência e amor dedicados ao longo da nossa caminhada juntos. Amo você.

À Professora Dra. Karin Werther, pelos ensinamentos transmitidos, pela orientação e paciência.

Aos Professores Drs. Hélio José Montassier e José Maurício Barbanti Duarte, pela participação na banca de qualificação desta dissertação e pelas considerações feitas.

À Professora Dra. Eliana Reiko Matushima e Dra. Eveline dos Santos Zanetti pela participação na banca de defesa, pela dedicação e pelas contribuições feitas, as quais, com certeza, engrandeceram este trabalho.

Às Dra. Leslie Woods e Dra. Beate Crossley, da Universidade da Califórnia, pela oportunidade concedida para visita e pesquisa no Laboratório do “California Animal Health and Food Safety” (CAHFS). Bem como a todos os funcionários, pelo auxílio prestado e pela paciência.

Aos amigos feitos ao longo dessa jornada, em especial à Denise G. Chung, por toda a ajuda sempre dedicada, pelo apoio, amizade e pelos conselhos. Aos amigos de república Flávio (Carioca), Rodrigo (Pri), Nathan, Érico, Pedro Paulo, Marcus (Psico), Juliana (Jú), Regina (Estrelinha), Alexandre (Lombriga), Cássia, Marco Augusto (Marquim), Cinthia, Juliana e Alanna por tornarem minha vida mais alegre e divertida. Aos demais amigos, que apesar de não citados aqui, também engrandecem minha vida.

Aos amigos Pedro H. Teles, Juliana P. de Oliveira, Cinthia G. Candioto, Eliane de Sousa e Alexandre A. Torres, pela amizade, pelo trabalho em equipe e pela ajuda na realização de algumas etapas desse trabalho. Bem como aos servidores do Departamento de Patologia Veterinária: Francisca de Assis Ardisson, Edgar Homem e Narcizo Batista Tel.

Aos animais que fazem ou fizeram parte da minha vida e que me permitem constantemente aprender com eles e ser uma pessoa melhor.

A FAPESP pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa (Processo 2010/14787-4).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.	xii
LISTA DE FIGURAS.	xiii
RESUMO.	xv
ABSTRACT.	xvi
I. INTRODUÇÃO.	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.	2
2.1 Cervídeos: aspectos gerais.	2
2.2 Adenovírus.	3
2.3 Reovírus.	6
III. MATERIAL E MÉTODOS.	12
3.1 Animais.	12
3.2 Exame necroscópico, microscópico e colheita de material.	13
3.3 Imunoistoquímica.	14

3.4	Reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa.	15
3.4.1	Extração do RNA.	15
3.4.2	RT-PCR em tempo real	17
3.4.3	Eletroforese em gel de agarose e sequenciamento.	17
IV.	RESULTADOS.	19
V.	DISCUSSÃO.	32
VI.	CONCLUSÕES.	38
VII.	IMPLICAÇÕES.	39
VIII.	REFERÊNCIAS.	40
	APÊNDICES	55
	Apêndice A. Aprovação do presente trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. . .	56
	Apêndice B. Autorização concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade para coleta e exportação de material de cervídeos brasileiros (fixados em formalina	

e emblocados em parafina).	57
Apêndice C. Dados dos cervídeos que apresentaram lesões macro e/ou microscópicas sugestivas de doenças hemorrágicas virais	60
Apêndice D. Autorização do Governo Americano para entrada de materiais de cervídeos brasileiros (fixados em formol e emblocados em parafina).	66
Apêndice E. Resultados da detecção dos vírus da Língua azul e Doença epizoótica hemorrágica em cervídeos brasileiros utilizando RT-PCR em tempo real realizados no laboratório do CAHFS (California Animal Health and Food Safety).	68

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementar

Ct = Cycle threshold

DEH = Doença epizootica hemorrágica

DHA = Doença hemorrágica por adenovírus

DNA = Ácido desoxirribonucleico

ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay

kDa = Kilodalton

LA = Língua azul

nm = Nanômetro

PCR = Reação em cadeia da polimerase

RNA = Ácido ribonucleico

RNases = Ribonucleases

RT-PCR = Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Necropsia de Veado-mateiro (<i>M. americana</i>, RG 29191, 173/08) com lesões sugestivas de doença hemorrágica viral. Petéquias no endocárdio e na inserção das cordas tendíneas (setas) (A). Conteúdo intestinal sanguinolento, com presença de mucosa avermelhada (B).</p>	3
<p>Figura 2. Esquema das etapas de desparafinização e extração de RNA a partir de tecidos incluídos em parafina.</p>	16
<p>Figura 3. Imagem das curvas geradas no RT-PCR em tempo real realizado para vírus da doença epizootica hemorrágica em material de cervídeos brasileiros. Curva gerada pelo controle positivo (seta), com valor de Cycle threshold (Ct) igual a 30,96, demonstrando crescente liberação de fluorescência de acordo com a quantidade de ciclos realizados. Abaixo da linha de base (—) encontram-se as amostras testadas, todas negativas</p>	24
<p>Figura 4. Imagem de eletroforese em gel de agarose realizado com as amostras de cervídeos brasileiros para doença epizootica hemorrágica, sendo todas as amostras negativas, sem formação de bandas características. Os controles positivo (PCR+) e negativo (PCR-) estão localizados no lado direito da imagem.</p>	24
<p>Figura 5. Imagem das curvas geradas no RT-PCR em tempo real realizado para vírus da língua azul de amostras de cervídeos brasileiros. Acima da linha de base (—) encontram-se as amostras positivas</p>	

dos animais número 13 (Ct 32,30), 15 (Ct 40,26), 8 (Ct 34,71), 36 (Ct 34,47), 22 (Ct 39,73) e 16 (Ct 46,11). Abaixo da linha de base encontram-se as amostras negativas. O controle positivo (C) apresentou Ct igual a 31,31. 25

Figura 6. Imagem de eletroforese em gel de agarose 4% realizado em amostras de cervídeos brasileiros para língua azul, sendo amostras de número 8, 13, 14, 15, 16, 22 e 36 positivas, com formação de bandas características. Os controles positivo (PCR+) e negativo (PCR-) estão localizados no lado direito da imagem. 26

Figura 7. Fotomicrografia de Veado-catingueiro (*M. gouazoubira*, RG 18087, 31/01) acometido por língua azul. Hemorragia acentuada em musculatura (A). Infiltrado inflamatório periglomerular (B). (Coloração HE). 31

PESQUISA DE AGENTES VIRAIS DE DOENÇAS HEMORRÁGICAS EM CERVÍDEOS BRASILEIROS: ESTUDO RETROSPECTIVO

RESUMO Os cervídeos têm sido acometidos por doenças hemorrágicas virais, tais como, doença epizoótica hemorrágica (DEH), língua azul (LA) e doença hemorrágica por adenovírus (DHA). Como as lesões macroscópicas, entre elas, enterite hemorrágica, edema pulmonar, petéquias e sufusões em diversos órgãos, são observadas nas três doenças, há necessidade de técnicas acuradas para realizar o diagnóstico definitivo. A partir do material de arquivo (blocos de parafina) existente no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, 42 cervídeos brasileiros, tanto de vida livre como de cativeiro, foram selecionados, por apresentarem sinais clínicos e/ou lesões macroscópicas sugestivas de doenças virais hemorrágicas. Das amostras analisadas, utilizando técnica de imunoistoquímica, todas apresentaram resultado negativo para adenovírus. Utilizando técnica de RT-PCR em tempo real para vírus da doença epizoótica hemorrágica, os resultados foram também negativos. A mesma técnica aplicada para vírus da língua azul revelou sete animais positivos (16,66%) confirmados com eletroforese em gel de agarose 4% e sequenciamento. Todos os casos positivos foram de animais provenientes de cativeiro, sendo três fêmeas (duas jovens, uma adulta) e quatro machos jovens. As principais alterações macroscópicas observadas nesses animais foram conteúdo intestinal hemorrágico, mucosas avermelhadas do trato gastrointestinal, úlceras em língua e petéquias em diversos órgãos. Na histologia observou-se principalmente infiltrado inflamatório, hemorragia e congestão em diversos órgãos. Os vírus da DHA e DEH não estão envolvidos nos óbitos dos cervídeos estudados. A relevância deste trabalho está no fato de ser a primeira descrição de material genético do vírus da LA em cervídeos brasileiros.

Palavras-Chave: adenovírus, cervídeos brasileiros, doença epizoótica hemorrágica, imunoistoquímica, língua azul, RT-PCR.

RESEARCH OF VIRAL HEMORRHAGIC DISEASES AGENTS IN BRAZILIAN CERVIDS: A RETROSPECTIVE STUDY

ABSTRACT Cervids have been affected by viral hemorrhagic diseases, such as Epizootic hemorrhagic disease (EHD), Bluetongue (BT), and Adenoviral hemorrhagic disease (AHD). Once that gross lesions, among them, hemorrhagic enteritis, pulmonary edema, petechiae and suffusions in several organs, are similar, it is necessary to use accurate techniques to the definitive diagnosis. From the archival material (paraffin blocks) available in the Department of Veterinary Pathology of FCAV – Unesp, 42 Brazilian deer, both free living and captive, were selected because they had lesions suggestive of hemorrhagic viral disease. The samples analyzed, using Immunohistochemistry, were all negative for adenovirus. Using real time RT-PCR for EHD, the results were also negative. The same technique applied to BT virus revealed seven positive animals (16,66%) confirmed after agarose 4% gel electrophoresis and gene sequencing. The main macroscopic changes observed in these animals were hemorrhagic intestinal contents, reddish mucous membrane of the gastrointestinal tract, ulcers on tongue and petechiae in various organs. Mostly histological changes observed were inflammatory infiltrate, hemorrhage, and congestion in various organs. All positive cases were from captive animals, three females (two young and one adult), and four young males. The AHD and EHD virus are not involved in the deaths of the deers studied in this research. The significance of this study is due to the fact that it was the first time the genome of BT virus was identified in Brazilian cervids.

Keywords: adenovirus, Brazilian cervids, epizootic hemorrhagic disease, immunohistochemistry, bluetongue, RT-PCR.

I. INTRODUÇÃO

No Brasil existem atualmente oito espécies de cervídeos, das quais duas apresentam status de conservação vulnerável (IUCN, 2012). O declínio populacional das espécies deve-se principalmente às alterações e perda do habitat, devido ao avanço de fronteiras agrícolas e urbanas, enfermidades e atividades predatórias de caça. As doenças introduzidas por bovinos são uma das principais causas de mortalidade, uma vez que inúmeras doenças virais, bacterianas e parasitárias comuns ao gado afetam os cervídeos (PINDER & LEEUWENBERG, 1997).

Desde 1994 têm sido realizadas necropsias de cervídeos no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp. Frequentemente os animais apresentam lesões macro e microscópicas sugestivas de doenças hemorrágicas virais, porém, sem identificação de tais agentes nos animais.

Considerando que cervídeos acometidos pela doença epizoótica hemorrágica (DEH), pela língua azul (LA) e pela doença hemorrágica por adenovírus (DHA) apresentam sinais clínicos e lesões semelhantes (WOODS et al., 1996), é necessário o uso de outras técnicas de diagnóstico laboratorial para elucidar a etiologia desses processos infecciosos, como imunoistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e/ou detecção de material genético, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Objetivou-se com este estudo retrospectivo verificar a presença dos agentes etiológicos envolvidos na DHA, DEH e LA, a partir de amostras de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cervídeos: Aspectos Gerais

A família Cervidae, pertencente à ordem Artiodactyla é composta por 17 gêneros e 52 espécies, que se distribuem naturalmente por toda a América do Norte, América do Sul e Eurásia, na maioria das ilhas continentais associadas e norte da África (GRUBB, 2005; NOWAK, 1999). Caracterizam-se pela presença de cascos que recobrem os quatro dedos, sendo que somente dois deles se apóiam no solo (DUARTE, 2007).

No Brasil existem hoje oito espécies 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, 2012 (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*), duas espécies encontram-se na categoria vulnerável: Cervo-do-Pantanal e Veado-mateiro-pequeno.

Aparentemente, as doenças hemorrágicas têm sido importantes enfermidades de cervídeos em cativeiro no Brasil. Vários plantéis têm sido acometidos por doenças hemorrágicas de etiologia desconhecida, 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 sua descrição 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).

As doenças hemorrágicas que ocorrem em cervídeos citadas em literatura são DHA; LA e DEH, sendo as duas últimas causadas por reovírus. Alguns estudos sorológicos foram realizados no Brasil para detecção de anticorpos contra vírus da LA e vírus da DEH em ruminantes domésticos e selvagens (ALVES et al. 2009; MELO et al.,

2000; MOTA et al. 2011; PANDOLFI, 1999). Não há relatos de ocorrência da doença hemorrágica por adenovírus em território brasileiro.

As lesões nos animais acometidos por essas enfermidades são semelhantes entre si (SORDEN et al., 2000) (Figura 1), não sendo possível o diagnóstico apenas por achados macro ou microscópicos, havendo necessidade de aplicação de técnicas laboratoriais para o diagnóstico etiológico.

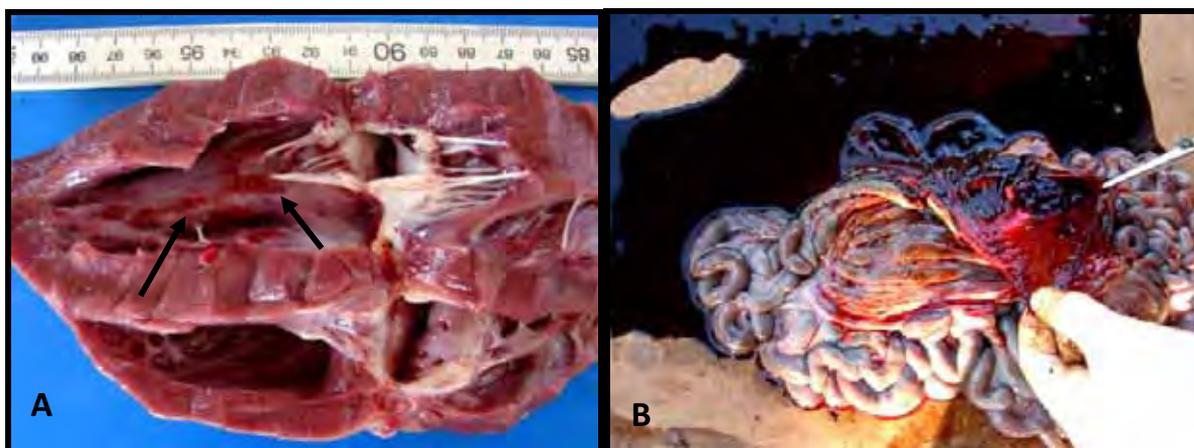


Figura 1: Necropsia de Veado-mateiro (*M. americana*, RG 29191, 173/08) com lesões sugestivas de doença hemorrágica viral. Petéquias no endocárdio e na inserção das cordas tendíneas (setas) (A). Conteúdo intestinal sanguinolento, com presença de mucosa avermelhada (B).

2.2 Adenovírus

Adenoviridae é uma família de vírus de distribuição cosmopolita (HORWITZ, 1990) e que foram isolados de várias espécies de vertebrados, incluindo peixes, anfíbios e répteis (RUSSELL & BENKÖ, 1999). A maioria dos adenovírus está envolvida em infecções do trato respiratório, mas também podem acometer o trato digestório (MORAES & COSTA, 2007), urinário, em humanos causa lesões oculares (KINCHINGTON et al., 1994) e hepatite em cães (MURPHY et al., 1999).

A denominação dessa família originou-se do primeiro vírus do grupo, que foi isolado a partir de glândulas adenoides humanas em 1953. No ano seguinte o primeiro

adenovírus de interesse veterinário foi isolado de casos de hepatite canina (MORAES & COSTA, 2007).

A família Adenoviridae era originalmente dividida em dois gêneros, *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*, baseado no isolamento em mamíferos e aves respectivamente, e na detecção de antígeno gênero específico detectável pelas técnicas de fixação de complemento, imunodifusão em gel de Agar e imunofluorescência (LEHMKUHL & HOBBS, 2008). Após análise completa da sequência de DNA dos adenovírus, foram observados diferentes tipos de arranjos genômicos, distintos daqueles observados nos dois gêneros oficialmente reconhecidos (BENKÖ & HARRACH, 1998). Os gêneros *Atadenovirus* e *Siadenovirus* foram então propostos e aceitos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, em encontro realizado em Paris, França, no ano de 2002 (LEHMKUHL & HOBBS, 2008), sendo o adenovírus que afeta os cervídeos, pertencente ao gênero *Atadenovirus* (LEHMKUHL et al., 2001, ZAKHARTCHOUK et al., 2002).

Os adenovírus são partículas não envelopadas, icosaédricas, com 80-100 nm de diâmetro; os capsídeos são compostos de 252 capsômeros, 240 hexons e 12 pentons (MURPHY et al., 1999). O genoma consiste numa molécula linear de fita dupla de DNA com peso entre 20 e 25 kDa (WOODS, 2001). Altamente espécie específicos, os adenovírus possuem tropismo pelo epitélio ou endotélio de vasos do trato respiratório e digestório (WOODS, 2001). A via de eliminação/transmissão geralmente ocorre através de secreções nasais, fezes e urina (HORWITZ, 1990).

O adenovírus foi a causa de centenas de mortes em cervídeos de vida livre da Califórnia em surto ocorrido em 1993-1994 (WOODS et al., 1996), em mortes esporádicas ocorridas em 1997 e 1998 em Veado-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (SORDEN et al., 2000) e também em veados no Oregon em 2002 (ODFW - Oregon Department of Fish and Wildlife). Foi descrita também no Canadá, acometendo alces (*Alces alces*) (SHILTON et al., 2002). Experimentalmente foi inoculada em Veado-da-cauda-preta (*Odocoileus hemionus columbianus*) (WOODS et al., 1997) e Veado-da-cauda-branca (WOODS et al., 2001) que mostraram susceptibilidade ao vírus. Inoculação experimental foi realizada também em bezerros,

que não apresentaram sinais clínicos, lesões ou presença do vírus, demonstrando serem resistentes à infecção por adenovírus de cervídeos (WOODS et al., 2008). No Brasil ainda não há relatos da ocorrência do agente.

Os sinais clínicos apresentados por cervídeos que vieram a óbito devido doença hemorrágica aguda foram: ptialismo, diarreia, convulsões e decúbito seguido de morte (WOODS et al., 1999). Os animais necropsiados que desenvolveram a doença geralmente apresentaram hemorragia no intestino delgado e grosso, pulmões com edema interlobular marcante, espuma esbranquiçada em brônquios e traqueia, assim como lesões necróticas severas em diversos locais da cavidade oral (faringe, gengiva, língua, lábios, palato duro), cavidade nasal, mandíbula, maxila e estômagos (WOODS et al., 1999).

Microscopicamente, vasculite aguda com inclusões intranucleares eosinofílicas ou anfólicas nas células endoteliais foram encontradas na maioria dos casos (WOODS et al., 1996). Os lóbulos pulmonares encontraram-se separados por edema dos septos interlobulares. Células endoteliais das veias, vênulas, artérias, arteríolas e capilares peribrônquicos encontram-se hipertróficas e algumas apresentaram cariorréxis (WOODS et al., 2001). Outras alterações vasculares foram: necrose endotelial, ruptura da túnica íntima (aparentemente pelo edema ou infiltrado leucocitário), marginação leucocitária, necrose fibrinóide e presença de infiltrado leucocitário na túnica média (WOODS et al., 1999). Alterações vasculares intestinais foram encontradas principalmente em serosa e submucosa de artérias e veias de grande calibre, e incluem hipertrofia do endotélio, podendo haver presença de corpúsculos de inclusão intranucleares. Hemorragia difusa na lâmina própria da mucosa intestinal com sufusão para o lúmen também pode estar presente (WOODS et al., 2001). Lesões orais em infecções por adenovírus na forma localizada caracterizam-se por regiões extensas de necrose bem delimitadas por uma zona densa de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas e linfócitos), associada a bactérias (WOODS et al., 1999).

O diagnóstico de adenovírus é baseado nos achados de necropsia, isolamento viral, identificação por microscopia eletrônica de transmissão ou varredura, testes de

anticorpos fluorescentes e imunistoquímica (WOODS et al., 1996; WOODS et al. 1999). Testes de soro neutralização e imunoenzimáticos ELISA foram desenvolvidos por LAPOINTE et al. (2000) para comprovação de existência de anticorpos. Diagnóstico com uso de PCR foram descritos para detecção de adenovírus em humanos (COOPER et al., 1999; ECHAVARRIA et al., 1998), répteis (WELLEHAN et al., 2004) e aves domésticas e silvestres (HESS et al., 1999; LÜSCHOW et al., 2007).

2.3 Reovírus

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 (ALFIERI et al., 2007). Os vírions dessa família possuem 65-80 nm de diâmetro, são desprovidos de envelope e caracterizados por estrutura dupla de capsídeo, sendo um externo e um interno (ROY, 1996). A camada externa é difusa e responsável pelo formato de anel que as partículas apresentam (MONATH & GUIRAKHOO, 1996).

Dos 11 gêneros que possui apenas cinco infectam vertebrados (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* e *Aquareovirus*). Destes, apenas os gêneros *Orbivirus* e *Rotavirus* ocasionam infecções que, por suas características epidemiológicas e pela gravidade dos sinais clínicos, são considerados importantes em mamíferos (ALFIERI et al., 2007).

Com base na reatividade sorológica, 19 espécies de orbivírus, abrangendo pelo menos 130 sorotipos, já foram definidas. A maioria desses vírus é transmitida por vetores, sendo a LA e a DEH as enfermidades que apresentam importância nas populações selvagens (HOWERTH et al., 2001). Os agentes etiológicos das duas doenças causam em animais susceptíveis lesões semelhantes. Apesar de serem enfermidades distintas, podem acometer simultaneamente o mesmo animal (HOFF & TRAINER, 1974).

Há oito sorotipos descritos de vírus da DEH, sorotipos 1 e 2 originalmente isolados em New Jersey (EUA) e Alberta (Canadá), sorotipos 3 e 4 na Nigéria e

sorotipos 5, 6, 7 e 8 isolados na Austrália (ARAÚJO JR et al., 2010). A DEH ocorre na América do Norte, Austrália, Ásia e África, porém animais soropositivos foram identificados também na América do Sul (CFSPH, 2006). O primeiro isolamento do vírus da DEH foi realizado em 1955 de um Veado-da-cauda-branca em New Jersey (SHOPE et al., 1960). Em 1990, a doença hemorrágica foi descrita em 32 estados nos Estados Unidos acometendo cervídeos (GIBBS & GREINER, 1989; NETTLES & STALLKNECHT, 1992).

A LA já era conhecida pelos criadores de animais na África do Sul durante o início do século XIX. 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). Na Índia onde são descritos 18 sorotipos, é considerada endêmica (PRASAD et al., 1992). No mundo todo são conhecidos 25 sorotipos (DAVIES et al., 1992). O isolamento do vírus da LA de animais oriundos do Brasil foram relatados por GROOCOCK & CAMPBELL (1982), tendo isolado o sorotipo 4 em gado zebu e por CLAVIJO et al. (2002), isolado o sorotipo 12 em ovinos do estado do Paraná.

O vírus da LA causa anualmente para a indústria pecuária dos Estados Unidos uma perda estimada em 125 milhões de dólares, devido restrições de movimentação de animais e germoplasma para países livres da doença. Economicamente, é considerado o arbovírus mais importante que afeta animais nesse país (TABACHNICK, 1996). No mundo estima-se uma perda anual de cerca de três bilhões de dólares (BATH, 1989).

Em meados do século XX, DU TOIT (1944) demonstrou a transmissão da enfermidade por meio de *Culicoides*. Múltiplos sorotipos têm sido identificados no mesmo inseto, indicando que vírus geneticamente distintos podem estar presentes em um único hospedeiro (ALFIERI et al., 2007). Acredita-se que a variação geográfica na distribuição das doenças hemorrágicas ocorra devido interação de vários fatores, incluindo abundância e distribuição de mosquitos *Culicoides*, sorotipo e patogenicidade dos vírus da LA e DEH, imunidade dos animais e variações genéticas em cervídeos susceptíveis (STALLKNECHT et al., 2002).

A infecção por orbivírus ocorre após a picada do mosquito-pólvora *Culicoides* infectado. 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 para outros linfonodos, baço, medula óssea e outros tecidos (ALFIERI et al., 2007, KITCHING, 2008). Nesses tecidos, o vírus se replica no sistema microvascular, resultando nas alterações patológicas características da doença.

Após a infecção por orbivírus, os animais desenvolvem resposta imune humoral e celular. Os anticorpos virais-neutralizantes (tipo específico) e não neutralizantes (grupo específico) se desenvolvem de 7 a 14 dias após infecção. No entanto, os vírus podem coexistir com altos títulos de anticorpos por períodos de tempo variáveis (STOTT, 1999). O período de incubação em ruminantes silvestres varia de 10 a 20 dias e surtos são mais comuns nas estações quentes e úmidas, que favorecem o aparecimento dos *Culicoides* e, conseqüentemente, a 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).

Os sinais clínicos da LA podem variar de acordo com a espécie afetada, sorotipo do vírus e estado imune do animal (THORNE, 1982a). 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). 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 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).

A DEH em cervídeos manifesta-se por doença hemorrágica superaguda, aguda ou crônica (PRESTWOOD et al., 1974; THORNE, 1982b). A forma superaguda caracteriza-se por febre, anorexia, fraqueza, dispneia, edema acentuado na cabeça, pescoço e língua. Na forma aguda os sinais clínicos podem estar acompanhados por extensivas hemorragias em vários tecidos, como pele, coração e trato gastrointestinal. Geralmente há salivação excessiva e descarga nasal; úlceras em língua, gengiva, palato, rúmen e omaso podem ser observados. Na forma crônica o animal fica doente por semanas, porém gradualmente se recupera. Muitas vezes é possível observar formação de anéis nos cascos, devido interrupção do crescimento. Podem desenvolver úlceras e erosões no rúmen, levando à emaciação (OIE, 2009). A mortalidade pode ser elevada, sendo que mais de 90% dos animais infectados vem a óbito entre 8 a 36 horas após início do aparecimento dos sinais clínicos, depois de um período de incubação de 5 a 10 dias (HOFF & TRAINER, 1981). Infecções experimentais em Veados-de-cauda-branca com vírus da DEH demonstraram viremia a partir do segundo ao quarto dia pós-infecção, com pico ocorrendo no dia 6 pós-infecção (GAYDOS et al., 2002).

Os achados macroscópicos em animais 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).

Histologicamente, 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).

O diagnóstico da LA e da DEH é realizado pelo isolamento viral, detecção de anticorpos específicos no soro do animal ou ainda detecção do genoma viral em amostras biológicas (ARADAIB et al., 1994). A técnica de RT-PCR fornece resultado muito mais rápido que o isolamento viral e possui a vantagem de poder ser realizado em tecidos não mais adequados para o isolamento (HOWERTH et al., 2001). Especificamente para diagnóstico da LA foram descritos métodos de imunistoquímica que demonstram a presença do vírus em tecidos congelados ou parafinizados (ANDERSON et al., 1989; MACLACHLAN et al., 1990). Recentemente, foi descrita uma metodologia (imunistoquímica) aplicada em tecidos parafinizados de ruminantes domésticos, que detecta a proteína viral estrutural VP7, abundante e bem conservada em tecidos (SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2010).

Não há tratamento específico para LA e DEH. 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).

A vacinação disponível somente para LA é usada em diversos países onde a doença é endêmica para limitar as perdas diretas, minimizar a circulação do vírus e permitir movimentação de animais (OIE, 2009). Até recentemente, as únicas vacinas comercializadas eram as com vírus vivo atenuado. A maioria dessas vacinas 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). Dentre as desvantagens do uso de vacinas com vírus vivo atenuado, podemos citar: desenvolvimento da doença em algumas raças de ovelhas susceptíveis, sorotipos podem ser transmitidos pelo vetor *Culicoides* e podem ocorrer rearranjos entre o vírus da vacina e os sorotipos presentes no campo. Vacinas inativadas estão sendo comercializadas, porém o custo é mais elevado e estudos sobre eficácia, duração da proteção e ocorrência de imunidade pelo colostro ainda estão em andamento (MELLOR et al., 2009).

O controle de áreas livres deve ser focado principalmente no controle de movimento de animais, em regras rígidas de importação e quarentena, geralmente acompanhada de dois a três testes sorológicos. Abrigar os animais em áreas protegidas de mosquitos durante a noite, reduzir a população de vetores com uso de inseticidas e larvicidas são medidas que podem ser adotadas (ALFIERI et al., 2007).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo foram utilizadas amostras de tecidos parafinizados, provenientes de cervídeos necropsiados entre os anos de 1994 a 2011 no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp. Toda pesquisa foi devidamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta instituição (protocolo número 009908/11, Apêndice A) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (autorização número 26519-1, Apêndice B).

Os animais eram todos da fauna brasileira oriundos de cativeiro e vida livre, sendo os primeiros provenientes de zoológicos, centro de pesquisa ou criadouros conservacionistas e os segundos encaminhados por bombeiros, pela Polícia Ambiental e por concessionárias de rodovias. De um total de 253 cervídeos necropsiados, foram selecionados 42 casos em que os animais apresentavam sinais clínicos e lesões macroscópicas sugestivas de doenças hemorrágicas (WOODS et al., 2001). Dos 42 cervídeos estudados, de ambos os sexos e de diferentes faixas etárias, oriundos de vida livre ou de cativeiro, 17 eram *B. dichotomus*, 12 *M. gouazoubira*, oito *M. americana*, três *M. nana*, um *M. bororo* e um *M. nemorivaga* (Tabela 1). Quanto à classificação de idade, animais até seis meses foram considerados filhotes, de sete meses a um ano, jovens e adultos a partir de um ano. Os animais, cujas idades não constavam nos dados de arquivo, foram agrupados e nomeados sem informação (S/i).

Os dados mais detalhados desses cervídeos (espécie, idade, sexo, origem, sinais clínicos, lesões macroscópicas) estão discriminados no apêndice C.

Tabela 1. Espécies, sexo, idade e origem de cervídeos selecionados para pesquisa de agentes virais de doenças hemorrágicas.

		<i>M.</i> <i>gouazoubira</i> (n= 12)	<i>M.</i> <i>nana</i> (n=3)	<i>M.</i> <i>bororo</i> (n=1)	<i>B.</i> <i>dichotomus</i> (n=17)	<i>M.</i> <i>nemorivaga</i> (n=1)	<i>M.</i> <i>americana</i> (n=8)
Sexo	Macho	6	2	1	5	-	3
	Fêmea	6	1	-	12	1	5
Idade	Filhote	-	-	-	2	-	-
	Jovem	2	-	-	8	-	3
	Adulto	8	3	1	7	-	5
	S/i	2	-	-	-	1	-
Origem	Zoológico	1	-	-	-	-	-
	Vida livre	3	-	-	1	-	-
	NUPECCE	8	3	1	3	1	8
	CCCP/CESP	-	-	-	13	-	-

Legenda: S/i = sem informação, NUPECCE = Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – Unesp/Jaboticabal, CCCP = Centro de Conservação de Cervo-do-Pantanal, CESP = Companhia Energética de São Paulo – Promissão/SP.

3.2 Exame necroscópico, microscópico e colheita de material

Os cervídeos foram submetidos a exame necroscópico detalhado, onde foram avaliados os órgãos, sua localização, aspecto externo, coloração, formato e tamanho. Em seguida foram colhidos fragmentos de diversos órgãos/tecidos, entre eles fígado, baço, pulmão, rim, sendo fixados em solução de formalina a 10%, tamponada. O tempo de permanência nessa solução variou de alguns dias até no máximo cinco meses. Após processos de rotina para histologia (desidratação, diafanização, parafinização e emblocamento em parafina), foram feitos cortes de 5µm de espessura que posteriormente foram submetidos à coloração de Hematoxilina-eosina e lidos em microscópio de luz. Todas essas etapas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, Campus de Jaboticabal.

3.3 Imunoistoquímica

Para o estudo da presença de adenovírus foi utilizada a técnica de imunoistoquímica, realizada no “California Animal Health and Food Safety Laboratory” (CAHFS) na Universidade da Califórnia, em Davis. Todas as etapas foram realizadas e acompanhadas, sob a supervisão da docente DVM, Ph.D. Leslie Woods. O material dos exames necroscópicos (item 3.2) em forma de blocos de parafina foram enviados com a respectiva autorização do ICMBio (autorização número 26519-1, Apêndice C) e autorização de recebimento do Governo americano (Apêndice D). A partir dos tecidos incluídos em parafina foram feitos dois cortes de 4µm de espessura de cada bloco, sendo um para o anticorpo específico e um para o anticorpo não específico (controle negativo). A desparafinização e hidratação foram feitas utilizando baterias de xilol e álcool em concentrações decrescentes. Em seguida, as lâminas foram incubadas em pepsina 0,5% à temperatura de 37°C durante 10 minutos para recuperação dos antígenos. As lâminas foram então lavadas em água corrente e solução salina tamponada tris-Tween, e acrescido 200 µL do anticorpo policlonal de coelho anti-adenovírus, na diluição de 1:1500. Nas lâminas para controle negativo foram colocados 200 µL do anticorpo não-específico – IgG de coelho, na diluição 1:1500. Tanto as lâminas com os anticorpos primários específicos quanto não-específicos ficaram durante 30 minutos à temperatura ambiente, e em seguida foram lavados com solução tampão.

Na etapa seguinte, todas as lâminas receberam 400 µL do anticorpo secundário: anticorpo biotilado de cabra anti-coelho (Vector Labs[®]) na diluição 1:200 e foram incubadas durante 30 minutos. Após lavagem com solução tampão, foram adicionados 400 µL de solução do conjugado (Horseradish Peroxidase-Labeled Streptoavidin, Jackson Lab[®]), diluição 1:1000. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com solução tampão. Em seguida foi colocado 400 µL de cromógeno 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, DakoCytomation[®]) sobre as lâminas e após 10 minutos foram novamente lavados com solução tampão. As lâminas foram então colocadas em

cubas contendo Hematoxilina de Mayer (Sigma[®]), onde permaneceram por 7 minutos e em seguida foram lavados em água corrente. As lâminas ficaram imersas durante 2 minutos em água corrente. A última etapa consistiu em cobrir as lâminas com meio de montagem aquoso, deixar secar durante 30 minutos e então cobri-las com meio de montagem sintético e lamínula para posteriormente serem lidas em microscópio de luz.

Além do processo manual de imunistoquímica descrito acima, metade do material (21 amostras) foi processada em equipamento automatizado “Immuno Autostainer” (Dako[®]). As únicas etapas que foram feitas manualmente após processar o material no “Immunoautostainer” foram a imersão em Hematoxilina de Mayer e cobertura com meio de montagem aquoso, meio de montagem sintético e lamínula.

3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa

Para investigar a presença dos agentes da LA e da DEH, o método utilizado foi RT-PCR em tempo real, incluindo as etapas de extração do RNA, RT-PCR em tempo real, eletroforese em gel de agarose e sequenciamento. Todos esses procedimentos foram acompanhados no “California Animal Health and Food Safety Laboratory” (CAHFS) na Universidade da Califórnia, em Davis, sob supervisão da DVM, Ph.D. Beate M. Crossley.

3.4.1 Extração do RNA

A partir de tecidos incluídos em parafina (item 3.2) foram feitos de cada bloco, quatro cortes de 20 µm de espessura, que foram colocados em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL. Para evitar contaminação entre os materiais, as navalhas do micrótomo foram trocadas a cada bloco cortado.

O processo de desparafinização dos tecidos e extração do RNA foram realizados utilizando o “RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit” (Ambion[®]), seguindo as instruções do manual do fabricante (Figura 2).

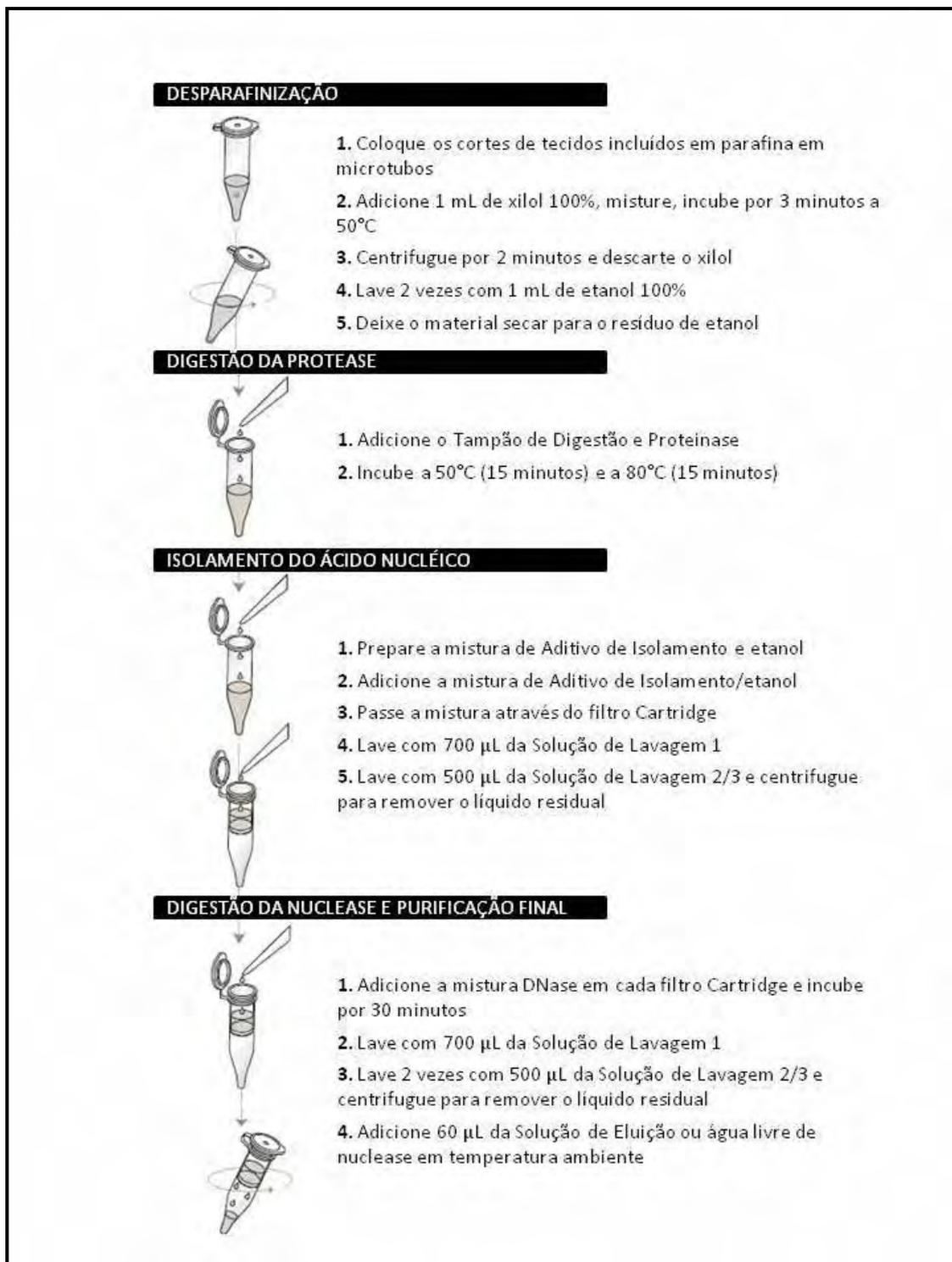


Figura 2. Esquema das etapas de desparafinização e extração de RNA a partir de tecidos incluídos em parafina.

3.4.2 RT-PCR em tempo real

Após extração do RNA foi realizada conversão em cDNA e RT-PCR em tempo real, utilizando os kits SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen[™], Life Technologies[®]) e Path-ID[™] Multiplex One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems[®]) para vírus da LA e vírus da DEH, respectivamente, de acordo com os protocolos descritos pelos fabricantes. Foi utilizado o termociclador Cepheid Smartcycler version 2d (Sunnyvale, CA) para realizar o RT-PCR em tempo real para vírus da LA. Para pesquisa do vírus da DEH foi utilizado termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Platform (Carlsbad, CA).

As reações para LA foram realizadas essencialmente como previamente descrito por ORRÚ et al. (2006), com as modificações sugeridas por HOFMANN et al. (2008). Para vírus da DEH foi utilizado protocolo desenvolvido na Universidade de Wisconsin, Madison (protocolo sob validação, dados ainda não publicados). Em cada reação foram acrescentados um controle negativo e um positivo. As reações foram realizadas nos termocicladores acima referidos, sendo que as condições de reação para vírus da LA foram um ciclo de 30 minutos a 48°C para síntese de cDNA, um ciclo de dois minutos a 95°C para desnaturação inicial e 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. As condições de reação para vírus da DEH foram um ciclo de 10 minutos a 50°C para síntese de cDNA, um ciclo de 10 minutos a 95°C para desnaturação inicial e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose e sequenciamento

Os materiais submetidos a RT-PCR em tempo real passaram também por outra análise, eletroforese em gel de agarose, a fim de confirmar a presença de bandas específicas dos amplicons com os tamanhos esperados. Para isso utilizou-se gel de agarose 4%, a corrente elétrica empregada foi de 210 volts durante 27 minutos. O marcador utilizado foi "All Purpose Hi-Lo DNA Marker" (Bionexus[®] Inc., Oakland, CA) e

os fragmentos amplificados foram visualizados com iluminação ultravioleta. Os produtos da RT-PCR foram purificados e submetidos a sequenciamento em “Davis Sequencing” (Davis, CA).

IV. RESULTADOS

A partir dos sinais clínicos (descritos nas fichas de arquivo) e dos achados macroscópicos sugestivos para doenças virais hemorrágicas, foram selecionados 42 cervídeos, cujos dados de sexo e idade estão compilados nas tabelas a seguir, agrupados pelas espécies analisadas, sendo a Tabela 2 representada pelos animais das espécies *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*, Tabela 3 referente à espécie *M. gouazoubira*, Tabela 4, animais da espécie *B. dichotomus*, e Tabela 5 espécie *M. americana*.

Tabela 2. Relação das espécies de *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. bororo* avaliados quanto ao sexo, idade, sinais clínicos e achados macroscópicos sugestivos para DHA, DEH, LA.

Espécie	Animal	Sexo	Idade	Sinais clínicos	Alterações macroscópicas
<i>M. nana</i>	2	macho	adulto	Apatia, hiporexia.	Conteúdo intestinal hemorrágico, petéquias no endocárdio e na serosa de estômagos, hidropericárdio.
	19	macho	adulto	Edema submandibular.	Hidropericárdio, sufusões em endocárdio, mucosa do abomaso hiperêmica.
	38	fêmea	adulto	Encontrado morto pelo tratador.	Sufusões e úlceras na língua, úlceras na mucosa do abomaso.
<i>M. nemorivaga</i>	7	fêmea	S/i	Hiporexia, emaciação	Fígado e pulmão congestos, conteúdo intestinal hemorrágico.
<i>M. bororo</i>	10	macho	adulto	Edema em face e língua, sangue nas fezes.	Petéquias em endocárdio, mucosa do abomaso hiperêmica, enterite hemorrágica.

Legenda: animais sem asterisco foram negativos para as três enfermidades analisadas.

Tabela 3. Relação de espécimes de *M. gouazoubira* avaliados quanto ao sexo, idade, sinais clínicos e achados macroscópicos sugestivos para doença hemorrágica por adenovírus, doença epizootica hemorragia e língua azul.

Espécie	Animal	Sexo	Idade	Sinais clínicos	Alterações macroscópicas
<i>M. gouazoubira</i>	1	macho	S/i	Anorexia, letargia, edema na cabeça e lesões na boca	Espuma em traqueia, petéquias em epicárdio.
	3	fêmea	adulto	Edema facial, prostração, lesões na boca.	Fígado, rim e pulmão congestos, petéquias em endocárdio.
	4	macho	jovem	Sem informações	Petéquias em endocárdio, traqueia hiperêmica, enterite hemorrágica.
	5	fêmea	adulto	Edema submandibular, lesões na boca, magro, anorexia, recém-parida.	Petéquias em endocárdio, fígado e pulmão congestos, mucosa intestinal hemorrágica.
	6	macho	adulto	Magro, apesar de alimentar-se bem, prostração e em seguida óbito.	Petéquias em língua, endocárdio e estômagos, edema pulmonar.
	8*	fêmea	adulto	Edema submandibular	Hemotórax, petéquias em língua e endocárdio, intestino com conteúdo hemorrágico.
	9	fêmea	adulto	Diarreia há 60 dias, apetite normal, emaciação.	Mucosa intestinal escurecida, pulmão e fígado congestos.
	12	macho	adulto	Emaciação, lesão na língua, sialorreia, prostrado.	Edema e congestão pulmonar, petéquias em endocárdio, perda do epitélio da língua, úlceras em duodeno.
	13*	macho	jovem	Anorexia, lesões na boca.	Conteúdo intestinal sanguinolento, edema pulmonar, petéquias em endocárdio, mucosa de rúmen e abomaso hiperêmicas.
	21	macho	S/i	Membro torácico esquerdo amputado.	Músculo branco, pulmão e fígado hemorrágicos, conteúdo intestinal hemorrágico.
	31	fêmea	adulto	Escoriações, fraturas de dentes, úlcera na língua, exposição de falanges.	Úlcera em língua, músculo branco em membros.
	32	fêmea	adulto	Escoriações em membros e cabeça devido ataque por cães, magra.	Pulmões hemorrágicos, conteúdo intestinal hemorrágico.

Legenda: * = animal positivo apenas para vírus da Língua azul (PCR), animais sem asterisco foram negativos para as três enfermidades analisadas.

Tabela 4. Relação de espécimes de *B. dichotomus* avaliados quanto ao sexo, idade, sinais clínicos e achados macroscópicos sugestivos para doença hemorrágica por adenovírus, doença epizootica hemorragia e língua azul.

Espécie	Animal	Sexo	Idade	Sinais clínicos	Alterações macroscópicas
<i>B. dichotomus</i>	11	fêmea	adulto	Recém-parida, apatia, emaciação, vômitos, histórico de abortos.	Pericardite, enterite hemorrágica, mucosa do abomaso hiperêmica.
	14*	macho	jovem	Decúbito lateral seguido de óbito.	Sufusões em mucosas dos estômagos, petéquias em endocárdio, intestino com conteúdo sanguinolento.
	15*	fêmea	jovem	Sem informações.	Úlcera na língua e rúmen, linfonodos aumentados.
	16*	macho	jovem	Apatia, sialorreia, anorexia, lesões em cavidade oral.	Enterite hemorrágica, lesões na língua, mucosas dos estômagos hiperêmicas.
	17	fêmea	jovem	Apatia, lesões na boca, dificuldade para se alimentar.	Lesões ulcerativas em cavidade oral, enterite hemorrágica.
	18	macho	adulto	Hiporexia e sialorreia.	Mucosa oral e dos estômagos hiperêmica, língua enegrecida, conteúdo intestinal sanguinolento.
	20	fêmea	adulto	Ferida em membro torácico esquerdo, mantida em caixa de transporte, hiporexia.	Petéquias na língua, edema pulmonar, hemopericárdio.
	22*	fêmea	jovem	Apatia, sialorreia, diarreia, decúbito lateral.	Úlceras e petéquias na língua, conteúdo sanguinolento em estômagos e intestinos, petéquias em endocárdio.
	23	fêmea	adulto	Sialorreia, dificuldade para se alimentar.	Enterite hemorrágica, lesões em palato duro.
	24	fêmea	adulto	Hiporexia há um mês, emaciação, decúbito.	Necrose em gengiva, líquido com sangue em cavidade torácica e abdominal.
	25	fêmea	jovem	Anorexia, apatia, sialorreia.	Petéquias em cavidade oral, endocárdio e pericárdio, enterite hemorrágica.
	26	fêmea	adulto	Apatia, lesões na boca, dificuldade respiratória, fezes pastosas.	Enterite hemorrágica, hiperemia em mucosas dos estômagos, hepatomegalia.
	27	macho	adulto	Hiporexia, diarreia, apatia, dificuldade para comer.	Cavidade oral arroxeadada, hemotórax, esplenomegalia, enterite hemorrágica.
28	macho	jovem	Sialorreia, hiporexia, lesões na boca, diarreia.	Enterite hemorrágica, líquido sanguinolento em cavidade torácica e abdominal.	

Continua

Espécie	Animal	Sexo	Idade	Sinais clínicos	Alterações macroscópicas
<i>B. dichotomus</i>	29	fêmea	jovem	Sialorreia, anorexia, apatia.	Petéquias na mucosa oral, enterite hemorrágica, líquido sanguinolento em cavidades torácica e abdominal, estômagos com mucosas hiperêmicas.
	30	fêmea	filhote	Dificuldade para mamar, apático, fezes com sangue.	Enterite hemorrágica.
	39	fêmea	filhote	Ainda mamava na mãe, decúbito lateral seguido de óbito.	Úlceras na língua, petéquias em coração, conteúdo intestinal sanguinolento, úlcera em abomaso.

Legenda: * = animal positivo apenas para vírus da Língua azul (PCR), animais sem asterisco foram negativos para as três enfermidades analisadas.

Tabela 5. Relação de espécimes de *M. americana* avaliados quanto ao sexo, idade, sinais clínicos e achados macroscópicos sugestivos para doença hemorrágica por adenovírus, doença epizoótica hemorragia e língua azul.

Espécie	Animal	Sexo	Idade	Sinais clínicos	Alterações macroscópicas
<i>M. americana</i>	33	fêmea	adulto	Trauma durante contenção, anorexia, animal prenhe.	Placas diftéricas na língua, edema em pulmão.
	34	fêmea	jovem	Apatia, hiporexia após soltura em piquete, fezes pastosas.	Mucosa do abomaso hiperêmica, intestino com conteúdo sanguinolento.
	35	fêmea	jovem	Apatia, hiporexia após soltura em piquete.	Intestino com conteúdo sanguinolento, papilas ruminais avermelhadas.
	36*	macho	jovem	Hiporexia após soltura em piquete.	Hemotórax, hemoperitônio, intestino com conteúdo sanguinolento.
	37	macho	adulto	Hiporexia há 12 dias, edema submandibular, decúbito seguido de óbito.	Petéquias na língua e coração, conteúdo intestinal sanguinolento, petéquias em endocárdio.
	40	fêmea	adulto	Anorexia, lesões na língua, decúbito lateral seguido de óbito.	Petéquias em língua e endocárdio, enterite hemorrágica, hiperemia em mucosa de estômagos.
	41	fêmea	adulto	Prostrado, dificuldade respiratória, diarreia.	Petéquias no endocárdio, intestino com conteúdo sanguinolento, fígado com manchas esbranquiçadas, mucosa do omaso e abomaso hiperêmicas.
	42	macho	adulto	Encontrado morto, em autólise.	Conteúdo intestinal avermelhado.

Legenda: * = animal positivo apenas para vírus da Língua azul (PCR), animais sem asterisco foram negativos para as três enfermidades analisadas.

Quanto aos sinais clínicos, um mesmo animal apresentava um ou mais sinais clínicos simultaneamente. A partir dos dados das Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 listadas acima os principais sinais foram: hiporexia em 35,71% (n=15), apatia em 28,57% (n=12) e lesões na língua/cavidade oral também em 28,57% (n=12). Outros sinais importantes como: diarreia/fezes pastosas (21,43%, n=9), emaciação (19,05%, n=8), sialorreia (19,05%, n=8) e edema em cabeça (16,67%, n=7) também foram verificados.

Os achados macroscópicos mais relevantes observados nas necropsias foram: conteúdo intestinal hemorrágico em 71,43% (n=30), petéquias em órgãos (47,62%, n=20) como coração (endocárdio), língua e estômagos, mucosas de trato gastrointestinal avermelhadas (33,33%, n=14) e necrose/úlcera em cavidade oral/língua em 26,19% (n=11).

Todos os 42 animais analisados, pela técnica de imunistoquímica para o agente da DHA, foram negativos.

Na pesquisa do vírus da DEH por RT-PCR em tempo real todas as amostras foram negativas, bem como na eletroforese em gel de agarose (Figuras 3 e 4). Os resultados finais de todas as amostras analisadas para DEH estão presentes no Apêndice C.



Figura 3. Imagem das curvas geradas no RT-PCR em tempo real realizado para vírus da doença epizootica hemorrágica em material de cervídeos brasileiros. Curva gerada pelo controle positivo (seta), com valor de Cycle threshold (Ct) igual a 30,96, demonstrando crescente liberação de fluorescência de acordo com a quantidade de ciclos realizados. Abaixo da linha de base (—) encontram-se as amostras testadas, todas negativas.

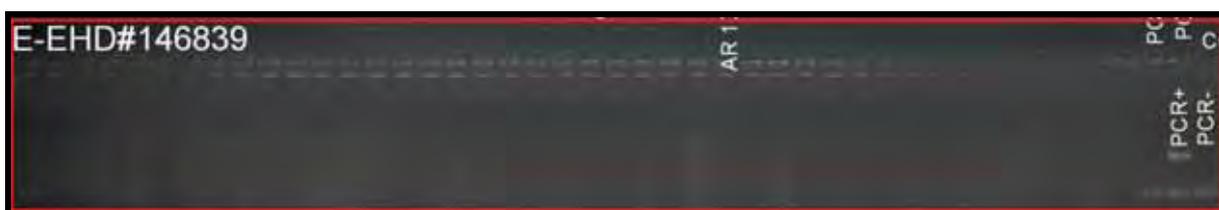


Figura 4. Imagem de eletroforese em gel de agarose realizado com as amostras de cervídeos brasileiros para doença epizootica hemorrágica, sendo todas as amostras negativas, sem formação de bandas características. Os controles positivo (PCR+) e negativo (PCR-) estão localizados no lado direito da imagem.

Os resultados finais das amostras analisadas pelo RT-PCR para LA estão presentes no Apêndice C. Para detecção do vírus da LA utilizando inicialmente a

técnica de RT-PCR em tempo real, três amostras foram positivas (7,14%) e quatro (9,52%) apresentaram valores de Ct elevados (animais número 14, 15, 16 e 22) quando comparados ao Ct do controle positivo (Figura 5).

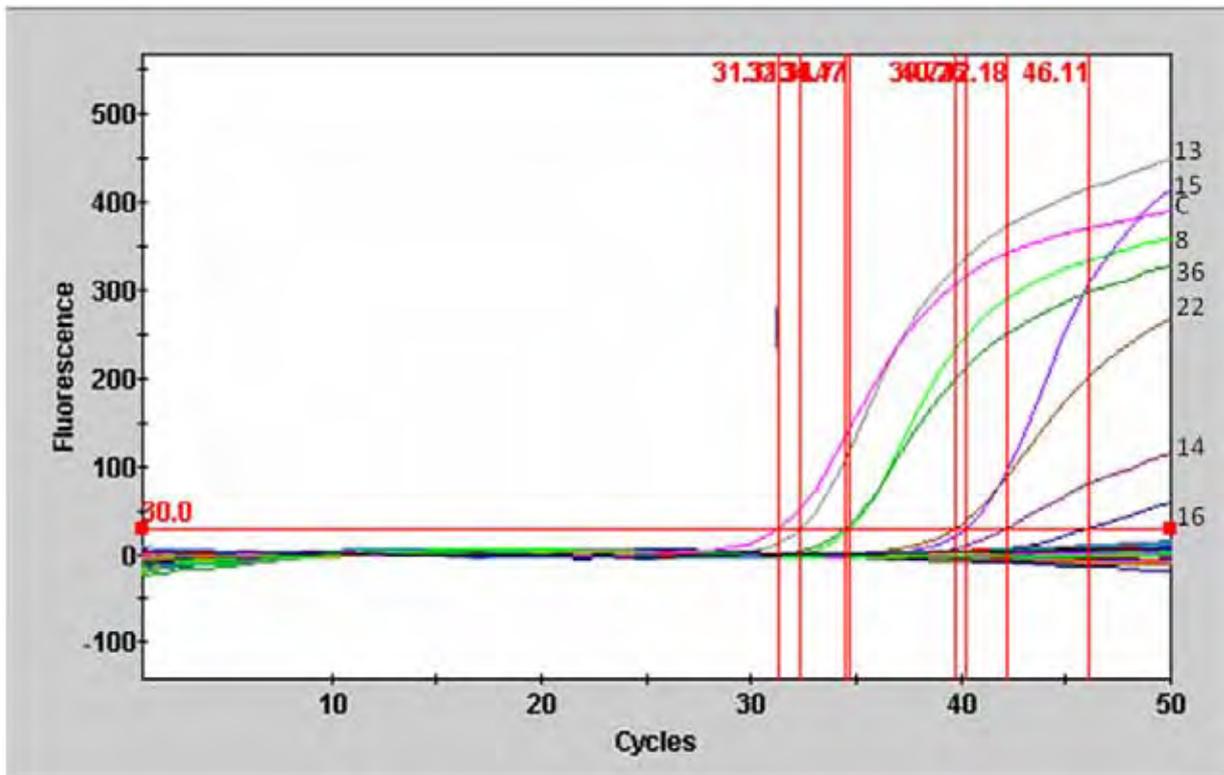


Figura 5. Imagem das curvas geradas no RT-PCR em tempo real realizado para vírus da língua azul de amostras de cervídeos brasileiros. Acima da linha de base (—) encontram-se as amostras positivas dos animais número 13 (Ct 32,30), 15 (Ct 40,26), 8 (Ct 34,71), 36 (Ct 34,47), 22 (Ct 39,73) e 16 (Ct 46,11). Abaixo da linha de base encontram-se as amostras negativas. O controle positivo (C) apresentou Ct igual a 31,31.

Para confirmação dos resultados dessa técnica, todas as amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 4%, onde se verificou resultados positivos para vírus da LA em sete amostras (16,66%) (Figura 6). Trata-se das mesmas amostras detectadas pelo RT-PCR (três positivas e quatro com valores de Ct muito acima do valor do controle positivo).

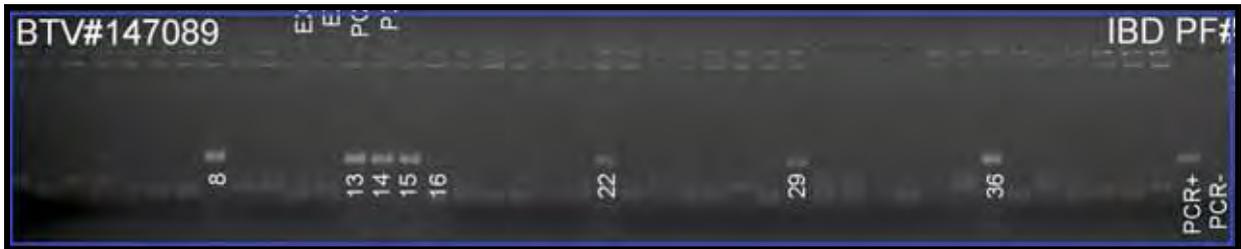


Figura 6. Imagem de eletroforese em gel de agarose 4% realizado em amostras de cervídeos brasileiros para língua azul, sendo amostras de número 8, 13, 14, 15, 16, 22 e 36 positivas, com formação de bandas características. Os controles positivo (PCR+) e negativo (PCR-) estão localizados no lado direito da imagem.

As bandas positivas no gel de agarose 4% das sete amostras (número 8, 13, 14, 15, 16, 22 e 36) foram purificadas e sequenciadas, confirmando tratar-se de vírus da LA (Apêndice F).

Os sete animais positivos para língua azul eram provenientes de cativeiro, sendo dois *B. dichotomus* do CCCP (Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal) da CESP (Companhia Energética de São Paulo, Promissão – SP) e cinco cervídeos (dois *B. dichotomus*, dois *M. gouazoubira* e um *M. americana*) pertencentes ao plantel do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, Unesp, Jaboticabal – SP). Quanto à faixa etária, os animais acometidos eram seis jovens (85,71%) e um adulto (14,29%) e a distribuição por sexo era de três fêmeas (42,86%) e quatro machos (57,14%).

Quanto aos sinais clínicos observados nesses sete animais eles variaram desde sem sinais clínicos, sinais inespecíficos, como anorexia/hiporexia e apatia e sinais sugestivos tais como: edema submandibular e diarreia, observado em um animal, e sialorreia e lesões na língua, observado em dois animais.

A partir dos resultados positivos acima, os achados macro e microscópicos desses sete animais positivos para LA estão listados na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6. Alterações macroscópicas e microscópicas de cervídeos positivos para vírus da língua azul.

Nº do animal positivo	Alterações macroscópicas	Alterações microscópicas
8	<ul style="list-style-type: none"> - baço: manchas avermelhadas em cápsula. - fígado: congesto, manchas claras e petéquias. - língua: petéquias. - pulmão: áreas de congestão e hemorragia, edema. - rim: medular e cortical avermelhadas. - coração: petéquias no endocárdio. - traqueia: congesta. - intestino: conteúdo hemorrágico. - abomaso: mucosa avermelhada, serosa com petéquias. 	<ul style="list-style-type: none"> - baço: depleção linfoide, discreto infiltrado polimorfo nuclear difuso (esplenite). - fígado: moderada degeneração turva difusa, moderada degeneração gordurosa em região centro-lobular. - língua: nada digno de nota. - pulmão: moderada hemorragia alveolar focalmente extensa. - rim: moderada a discreta hemorragia em interstício, acentuada degeneração hidrópica difusa em túbulos contorcidos proximais.
13	<ul style="list-style-type: none"> - abomaso: mucosa hiperêmica. - coração: petéquias em região de inserção das cordas tendíneas do átrio direito. - fígado: congesto. - intestino: petéquias na mucosa e conteúdo sanguinolento. - pulmão: lobos bastante avermelhados, edema e enfisema. - rim: - traqueia: vasos congestos, espuma e muco. - rúmen: mucosa avermelhada. - baço: nada digno de nota. - língua: sufusão na base da língua. - bexiga: repleta, conteúdo avermelhado. 	<ul style="list-style-type: none"> - abomaso: leve hemorragia e congestão em mucosa e musculatura. - coração: área de fibrose focalmente extensa em epicárdio infiltrando no miocárdio, focos de necrose de coagulação. - fígado: moderado infiltrado inflamatório linfocítico difuso ao redor de ductos biliares (pericolangite). - intestino: moderada congestão em mucosa e submucosa difusa. - pulmão: discreto edema alveolar, moderada a acentuada congestão difusa, células linfoplasmocitárias próximo à arteríola. - rim: discreta congestão difusa, moderado infiltrado inflamatório difuso ao redor de glomérulos. - traqueia: moderada congestão difusa, dois focos de discreta hemorragia em submucosa. - músculo esquelético: acentuada hemorragia focalmente extensa.
14	<ul style="list-style-type: none"> - baço: nada digno de nota. - coração: sufusões em endocárdio. - fígado: congesto. - língua: nada digno de nota - pulmão: congesto. - traqueia: congesto. - rúmen: mucosa avermelhada. - omaso: mucosa avermelhada. 	<ul style="list-style-type: none"> - baço: folículos com quantidade reduzida de células. - coração: discreta hemorragia entre fibras do miocárdio. - fígado: moderada quantidade de bactérias de putrefação. - língua: nada digno de nota.

Continua

Nº do animal positivo	Alterações macroscópicas	Alterações microscópicas
14	<ul style="list-style-type: none"> - abomaso: mucosa avermelhada. - rim: em estado de autólise. - intestino: conteúdo hemorrágico. 	<ul style="list-style-type: none"> - pulmão: moderada congestão difusa, moderado infiltrado inflamatório linfocítico perivascular multifocal. - traqueia: congestão moderada difusa em submucosa, hemorragia acentuada em submucosa. - rúmen: moderada quantidade de bactérias de putrefação com desprendimento da mucosa, hemorragia moderada difusa em submucosa. - omaso: moderada quantidade de bactérias de putrefação, discreta congestão de vasos em submucosa difusa.
15	<ul style="list-style-type: none"> - língua: ulceração em terço caudal do epitélio com presença de material fibrinoso e purulento aderido. - coração: hipertrofia concêntrica dos ventrículos. - linfonodos: aumentados de tamanho. - rúmen: úlcera em mucosa de transição com omaso. - baço: nada digno de nota - fígado: nada digno de nota - pulmão: nada digno de nota - rim: nada digno de nota 	<ul style="list-style-type: none"> - baço: moderada quantidade de polimorfonucleares difuso, ausência de hemácias em polpa vermelha e evidência de células reticuloendoteliais difusa. - fígado: discreto a moderado infiltrado inflamatório misto próximo a ductos biliares multifocal (pericolangite linfoplasmocitária crônica), sinusóides preenchidos por sangue, hiperplasia de ductos biliares. - pulmão: discreto infiltrado polimorfonuclear difuso em interstício, discreto enfisema alveolar difuso, discreta quantidade de hemácias em espaço alveolar. - rim: moderada a acentuada hemorragia multifocal em medular. - músculo: nada digno de nota.
16	<ul style="list-style-type: none"> - baço: coloração clara com bordas acinzentadas, ao corte coloração vinho. - intestino: enterite hemorrágica intensa, reto com sangue vivo na luz do órgão. - pulmão: áreas de hepatização, enfisematoso e congesto. - língua: coloração arroxeadada, lesão esbranquiçada de 1 cm de diâmetro abaixo do ápice. - músculo: região de músculo branco em membros posteriores. - coração: sufusões em endocárdio. - rúmen, retículo, omaso e abomaso: mucosa avermelhadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - baço: folículos pouco desenvolvidos. - intestino: necrose focal em mucosa. - linfonodo: leve infiltrado polimorfonuclear (eosinófilo) focal em vasos, células endoteliais aumentadas, com citoplasma preenchido por pontos corados em azul. - pulmão: moderada a acentuada congestão difusa, moderado edema alveolar difuso, discreto a moderado enfisema difuso, leve quantidade de hemossiderina focal. - língua: nada digno de nota. - músculo: nada digno de nota. - coração: nada digno de nota.

Continua

Nº do animal positivo	Alterações macroscópicas	Alterações microscópicas
22	<ul style="list-style-type: none"> - língua: úlceras e petéquias na musculatura. - pulmão: coloração vermelho escuro em todo o órgão. - coração: sufusão no endocárdio e edema na válvula mitral. - baço: petéquias na serosa. - fígado: nada digno de nota. - rúmen: conteúdo sanguinolento e mucosa enegrecida. - linfonodo: nada digno de nota. - retículo: conteúdo sanguinolento e mucosa hiperêmica. - omaso: conteúdo sanguinolento e mucosa hiperêmica. - abomaso: conteúdo sanguinolento e mucosa hiperêmica. - intestino: conteúdo sanguinolento. - rim: área enegrecida de aproximadamente 5 cm de diâmetro. - bexiga: petéquias em serosa. 	<ul style="list-style-type: none"> - língua: perda de estrias transversais e hialinização das mesmas (necrose de coagulação), hemorragia moderada a acentuada focalmente extensa em camada muscular, infiltrado inflamatório mononuclear moderado focal próximo ao epitélio. - pulmão: quantidade moderada de pigmentos enegrecidos difuso, congestão acentuada difusa. - coração: hemorragia focalmente extensa entre fibras musculares, congestão acentuada difusa. - baço: perda do padrão folicular (diminuição do número de folículos), hiperplasia de linfócitos seguida de plasmócitos, hemorragia acentuada a moderada multifocal na cápsula. - fígado: moderado a acentuado infiltrado inflamatório linfocítico ao redor de dutos biliares (pericolangite), hiperplasia de custos biliares, leve a moderada congestão difusa. - rúmen: hemorragia moderada difusa em submucosa e leve em camada muscular multifocal. - linfonodo: hemorragia moderada a acentuada multifocal, alguns vasos com células da túnica média aumentadas. - intestino: proliferação intensa de linfócitos (em placas de Peyer), ausência de ápices nas vilosidades difusa, hemorragia leve a moderada multifocal nas vilosidades. - rim: discreto infiltrado inflamatório linfocítico periglomerular focal, necrose de coagulação acentuada difusa em porção contorcida, congestão moderada difusa. - músculo esquelético: necrose moderada multifocal.
36	<ul style="list-style-type: none"> - traqueia: espuma sanguinolenta. - pulmão: fibrina em ambos os lobos, ao corte flui líquido amarelado viscoso do parênquima. - coração: nada digno de nota. - baço: nada digno de nota. - fígado: nada digno de nota. - rúmen: hiperemia em algumas papilas. - retículo: nada digno de nota. 	<ul style="list-style-type: none"> - traqueia: leve congestão difusa em submucosa. - pulmão: acentuado enfisema interlobular difuso, congestão moderada difusa, edema leve a moderado multifocal. - coração: discreta necrose flocular focalmente extensa. - baço: moderada depleção linfoide difusa. - fígado: infiltrado inflamatório linfocítico discreto multifocal ao redor de ductos biliares, discreta hiperplasia de ductos biliares, moderada congestão difusa em sinusóides.

Continua

Nº do animal positivo	Alterações macroscópicas	Alterações microscópicas
36	<ul style="list-style-type: none"> - omaso: mucosa com áreas hiperêmicas. - abomaso: mucosa com áreas hiperêmicas. - intestino: conteúdo sanguinolento e mucosa hiperêmica. - rim: parênquima com coloração avermelhada acentuada. - linfonodos: nada digno de nota. 	<ul style="list-style-type: none"> - retículo: leve hemorragia multifocal. - omaso: nada digno de nota. - abomaso: nada digno de nota. - intestino: calcificação distrófica focalmente extensa, parasitas na serosa, acentuado edema de submucosa difuso. - rim: congestão moderada a intensa de glomérulos, trombo em artéria, necrose de coagulação acentuada difusa por toda porção contorcida. - linfonodos: moderada hiperplasia de folículos difusa, quantidade moderada de megacariócitos difusa, discreta hemorragia multifocal.

As principais alterações macroscópicas nos sete animais positivos foram conteúdo intestinal hemorrágico (85,71%, n=6), petéquias (57,14%, n=4) em língua e coração, mucosas avermelhadas do trato gastrointestinal (42,86%, n=3) e úlceras em língua (42,86%, n=2).

Nos exames histopatológicos dos animais positivos para LA (n=7) foram observados principalmente infiltrado inflamatório em 100%, em diversos órgãos, entre eles, no rim (Figura 7.A), fígado e pulmão; hemorragia (71,43%, n=5) em coração, rim, traqueia, rúmen e musculatura (Figura 7.B) e congestão (71,43%, n=5) em pulmão, rim, traqueia e fígado. Trombo em artéria no rim foi encontrado em 14,28% dos animais (n=1).

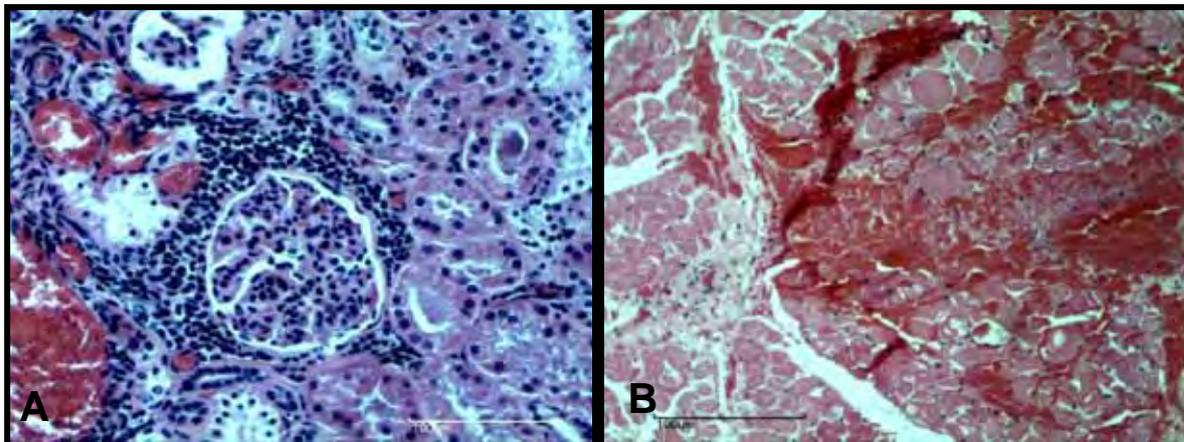


Figura 7. Fotomicrografia de órgãos de Veado-catingueiro (*M. gouazoubira*, RG 18087, 31/01) acometido por língua azul. Infiltrado inflamatório periglomerular (A). Hemorragia acentuada em musculatura (B). (Coloração HE)

V. DISCUSSÃO

No início da década de 90 foram publicados no Brasil os primeiros relatos de cervídeos com sinais clínicos e lesões sugestivas de doenças hemorrágicas, tais como LA e DEH, porém sem diagnóstico de agente etiológico envolvido (DUARTE & ARITA, 1992; MORATO et al., 1993; ARITA et al., 1997). Semelhante às lesões das doenças acima descritas, também são as alterações encontradas em animais acometidos por DHA (WOODS et al., 1996).

Os animais selecionados para o presente estudo exibiram como principais sinais clínicos hiporexia, apatia, lesões em língua e cavidade oral, diarreia, emaciação, edema em cabeça e sialorreia, sinais que condizem com aqueles encontrados em animais diagnosticados com doenças virais hemorrágicas (STOTT, 1999; MURPHY et al., 1999; WOODS et al., 2001). As lesões macroscópicas mais comumente encontradas neste trabalho corroboram aquelas citadas em literatura (WOODS et al., 1999, ALFIERI et al., 2007, MACLACHLAN, 2011), sendo, conteúdo intestinal hemorrágico, petéquias em diversos órgãos como coração (endocárdio), língua e estômagos, mucosas avermelhadas de trato gastrointestinal e necrose/úlcera em cavidade oral/língua.

No presente trabalho, utilizando a técnica de imunoistoquímica para vírus da DHA em 42 amostras de cervídeos brasileiros com lesões sugestivas, não foi possível detectar o agente etiológico em questão. Os resultados negativos encontrados para DHA poderiam ser decorrentes do processo de fixação das amostras. Dependendo do tempo de permanência das amostras na formalina ocorrem alterações estruturais no agente, dificultando a padronização e a eficiência da técnica de imunoistoquímica (SHI et al., 2005). Outra hipótese seria que os animais testados são realmente negativos, pela ausência do agente no ambiente ou pela resistência das espécies brasileiras à doença. A enfermidade foi diagnosticada em cervídeos nos Estados Unidos (Califórnia, Oregon e Iowa) e no Canadá (Ontário) causando altos índices de mortalidade (WOODS et al., 1996; SORDEN et al., 2000; SHILTON et al., 2002). Trata-se de uma doença viral

descrito por WOODS et al. (1996), cuja epidemiologia e patogenia ainda não foram totalmente elucidadas.

Devido à alta mortalidade e ausência de tratamento, é importante prevenir a introdução do adenovírus numa população de cervídeos susceptíveis. Para diminuir os riscos de introdução do vírus, recomenda-se não misturar animais oriundos de vida livre a animais de cativeiro, ainda que aparentemente saudáveis. Animais de cativeiro com histórico de infecção por adenovírus não devem ser transferidos para outros locais ou soltos na natureza, pois podem servir como carreadores do vírus (BOYCE et al., 2000). Fontes indiretas de contaminação também devem ser consideradas, uma vez que os adenovírus são estáveis no ambiente (MURPHY et al., 1999). Desse modo, é importante que exista vigilância epidemiológica e fiscalização rigorosa na entrada de possíveis animais portadores de adenovírus que causa a doença hemorrágica, principalmente oriundos de países onde ocorre a doença, como Canadá e Estados Unidos.

Na América do Norte, a caça legalizada facilitou o acesso ao material biológico (amostras de animais abatidos por caçadores) para pesquisas epidemiológicas na população de vida livre. Enquanto que no Brasil, a distribuição das espécies em seus diferentes habitat e a extensão do território brasileiro dificultam um monitoramento efetivo dos animais e de suas doenças. Por se tratar de uma enfermidade relativamente nova, ainda não haviam sido realizadas pesquisas de diagnóstico da mesma em território brasileiro, valorizando o trabalho aqui apresentado.

As outras duas doenças virais hemorrágicas estudadas nesse trabalho foram a LA e a DEH causadas por Orbivírus. Uma característica marcante da patogenia da infecção por esse vírus é sua capacidade de replicar e destruir células endoteliais em diferentes órgãos. A lise dessas células leva à injúria vascular, resultando em lesão dos capilares, hemorragias e coagulação intravascular disseminada (ALFIERI et al., 2007).

Neste estudo, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real para o vírus da DEH, todos os exames foram negativos. A DEH causa afecções graves apenas em ruminantes silvestres. A gravidade das lesões varia de acordo com a espécie acometida. Na América do Norte, o Veado-da-cauda-preta, a antilocapra (*Antilocapra*

americana), o Cervo-nobre (*Cervus elaphus*) e o Veado-da-cauda-branca são espécies susceptíveis à infecção pelo vírus da DEH, sendo a última mais sensível e na qual são observadas lesões mais graves, inclusive síndrome hemorrágica fatal (BRODIE et al., 1998).

Uma possível explicação para os resultados negativos seria a ausência do agente nas amostras analisadas. Por outro lado, estudos sorológicos realizados em 107 Cervos-do-Pantanal de vida livre em Promissão – SP (MONTASSIER et al., 2001) revelaram alta prevalência (71%) de animais com anticorpos para DEH. A maioria dos animais do presente trabalho era proveniente do NUPECCE, mesmo local onde PANDOLFI (1999) descreveu 9% do plantel de 22 animais sorologicamente positivos para DEH. Dessa maneira, os dois trabalhos acima relatados demonstram a existência do agente em território brasileiro (Estado de São Paulo), aumentando a expectativa de resultados positivos na detecção de material genômico do agente.

Outra explicação para os resultados negativos poderia ser o tempo de fixação em formalina, que variou de alguns dias a cinco meses. O processo de fixação altera o RNA, adicionando grupos metilol ($-CH_2OH$) aos nucleotídeos (MASSUDA et al., 1999). O tempo de arquivamento dos blocos de parafina também é um fator que pode interferir na integridade do material genômico, uma vez que degradação por RNases endógenas e fragmentação do RNA continuam a acontecer mesmo após o tecido ser desidratado e embebido em parafina, podendo interferir na transcrição reversa do RNA e reduzir a eficiência da PCR (MASSUDA et al., 1999; RIBEIRO-SILVA et al., 2007). O tempo de arquivamento dos blocos de parafina utilizados neste trabalho variou de um até 18 anos, podendo ter interferido nos resultados obtidos. Por outro lado, estudo realizado por MCKINNEY et al. (2009) demonstrou que é possível extrair e amplificar RNA a partir de tecidos fixados que permaneceram em formalina durante um período de tempo de 21 e 30 dias.

Quanto à doença da LA, ela ocorre em áreas tropicais e subtropicais, entre latitudes 40°N e 35°S, onde está concentrado aproximadamente 70,7% do rebanho ovino mundial, acometendo também caprinos, bovinos, bubalinos e cervídeos. Em

diversos países foram relatadas evidências sorológicas para o vírus da LA em ovinos e outros ruminantes, porém sem relatos da ocorrência da doença (ALFIERI et al., 2007).

Das 42 amostras analisadas por RT-PCR em tempo real e eletroforese em gel de agarose no presente estudo, sete animais (16,66%) foram positivos para vírus da LA. Os sinais clínicos observados nesses animais e no grupo de animais com alterações sugestivas de doenças hemorrágicas foram semelhantes. Dessa maneira, pode-se afirmar que os parâmetros utilizados (edema em cabeça, diarreia, sialorreia, lesões na língua/cavidade oral) para classificá-los em animais com lesões sugestivas de doenças virais hemorrágicas foram adequados e conferem com a literatura (WOODS et al., 1996, SORDEN et al., 2000).

Quanto à faixa etária, os cervídeos positivos eram seis jovens (85,7%) e um adulto (14,3%), sugerindo que os animais mais novos sejam mais susceptíveis à doença. Em relação ao sexo (três fêmeas e quatro machos) e as espécies acometidas (quatro *B. dichotomus*, dois *M. gouazoubira* e um *M. americana*) não foi possível sugerir correlação quanto à ocorrência da doença.

Todos os animais positivos foram oriundos de cativeiro, sendo cinco provenientes do NUPECCE. Nesse mesmo local foi realizado em anos anteriores (1998–1999) um estudo sorológico com ELISA competitivo comprovando a presença de anticorpos para vírus da LA em 23% de um total de 22 cervídeos analisados (PANDOLFI, 1999). A detecção de anticorpos e a comprovação da presença do agente nos animais do NUPECCE mostram que o plantel já teve contato com o vírus da LA, os animais são susceptíveis e eventualmente continuam albergando o agente. DUARTE (2007) refere que os surtos de enfermidades hemorrágicas ocorridos em cervídeos do NUPECCE acometidos durante vários anos, chegaram a gerar perda anuais de cerca de 50% do plantel. Em alguns anos, houve óbito de 90% dos animais. O controle da enfermidade foi feito com uso de telas nos galpões e ectoparasiticidas a cada 15 dias durante a primavera e verão.

As principais alterações macroscópicas nos sete animais positivos foram conteúdo intestinal hemorrágico (85,71%, n=6), petéquias (57,14%, n=4) em língua e coração, mucosas avermelhadas do trato gastrointestinal (42,86%, n=3) e úlceras em

língua (42,86%, n=2) conferindo com dados da literatura (HOFF & TRAINER, 1981; PARSONSON, 1990).

As alterações histológicas observadas nos animais positivos para LA foram principalmente infiltrado inflamatório em fígado, rim, pulmão, baço língua e linfonodo; além de hemorragia e congestão em diversos órgãos. Depleção linfóide e necrose em coração, rim, língua e intestino também foram observados. As lesões estão associadas ao dano vascular primário causado pela replicação viral (OSBURN, 2007), aumentando a permeabilidade vascular, favorecendo edema de tecidos, principalmente o pulmonar, e formando trombos e consequentes infartos (MACLACHLAN, 2004).

Os bovinos infectados por vírus da LA geralmente são assintomáticos e tem período de viremia longo, podendo atuar como reservatórios, infectando 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). Estudos sorológicos para LA realizados no território brasileiro em ruminantes domésticos (bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos) indicam que a infecção está amplamente distribuída em todas as regiões, incluindo a Paraíba (MELO et al., 2000; ALVES et al., 2009), Pernambuco (MOTA et al., 2011), Bahia (SOUZA et al., 2010), Minas Gerais (CASTRO et al., 1992; LAGE et al., 1996; KONRAD et al., 2003), São Paulo (NOGUEIRA et al., 2009, VENDITTI, 2009), Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2006) e Mato Grosso do Sul (PELLEGRIN et al., 1997). Em estudo sorológico com 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 fonte de infecção para os cervídeos acometidos no NUPECCE.

Pelos dados sorológicos obtidos associados com a falta de relatos clínicos, acredita-se que o vírus da LA perpetue-se de forma inaparente nos rebanhos brasileiros. As possíveis explicações para este fato são: baixa virulência dos sorotipos circulantes no país, maior resistência de algumas raças contra a infecção ou a característica endêmica que a infecção assume na maior parte do país (ALFIERI et al., 2007), onde as condições de temperatura e umidade favorecem a multiplicação e

manutenção dos vetores (LOBATO, 1996). Estudos com mosquitos *Culicoides*, incluindo a capacidade e competência do vetor e também de sorotipos que ocorrem nos ruminantes domésticos e selvagens devem ser considerados.

Considerando os aspectos epidemiológicos da doença, alguns autores propõem que o aquecimento global favorecerá o surgimento de doenças transmitidas por vetores (arbovírus), em parte, porque os insetos de áreas tropicais (vetores) e os agentes causadores irão expandir seus habitat à medida que o planeta aquece (GOULD et al., 2006; MACDONALD, 2008; PINTO et al., 2008; GOULD & HIGGS, 2009). No entanto, outros autores acreditam que o surgimento e propagação das infecções por arbovírus é um processo complexo e multifatorial, e faltam exemplos concretos de tais eventos onde o papel do aquecimento global tenha sido claramente definido (ZELL et al., 2008).

Os resultados negativos para LA podem ser justificados pelos mesmos motivos técnicos abordados nos resultados da DEH (tempo de fixação e de arquivamento dos blocos). Entretanto, neste estudo, as amostras positivas para LA foram fixadas em formalina por um período que variou de seis a 45 dias e o tempo de arquivamento dos blocos de parafina que originaram esta pesquisa foi de três a 15 anos, não interferindo com a positividade das amostras.

O sequenciamento e a identificação dos sorotipos do vírus da LA deste trabalho ficaram comprometidos devido à fragmentação do material genômico, possivelmente em decorrência da idade da amostra e da fixação em formalina.

Considerando os sinais clínicos e as lesões macroscópicas apresentadas pelos animais deste estudo e levando em consideração os resultados negativos para as três doenças virais pesquisadas, diagnóstico diferencial para outras enfermidades, tais como, febre aftosa, febre catarral maligna, diarreia viral bovina, rotavírus e coronavírus em filhotes, devem ser consideradas (HAIGH et al., 2002, WILLIAMSON et al., 2008).

VI. CONCLUSÕES

Os cervídeos brasileiros são acometidos pelo vírus da LA sendo o agente responsável detectado por diagnóstico molecular.

Apesar da fixação de amostras de tecidos em formalina por até 45 dias foi possível obter resultados positivos na detecção de material genômico pela técnica de PCR.

O tempo de arquivamento dos blocos de parafina por até 15 anos não interferiu na detecção de material genômico pela técnica de PCR.

VII. IMPLICAÇÕES

Estudos no Brasil com agentes virais causadores de doenças hemorrágicas em ruminantes domésticos e selvagens são escassos, tornando difícil a classificação do país em relação a essas enfermidades. A identificação dos sorotipos de Reovírus que ocorrem no Brasil é essencial para desenvolver e implementar programas com medidas apropriadas para o controle das enfermidades. Estudos moleculares e sorológicos integrados a estudos dos vetores devem ser conduzidos nos ruminantes domésticos e selvagens, não só no Brasil como na América do Sul como um todo, a fim de avaliar a situação atual dos vírus nas populações desses animais e os impactos que podem causar.

VIII. 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.

ALVES, F.A.L.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; SILVA, W.W.; SILVA, M.L.C.R.; LOBATO, Z.I.P.; CLEMENTINO, I.J. Soroprevalência e fatores de risco para a língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 484-489, 2009.

ANDERSON, G.A.; PHILLIPS, D.L., WALDVOGEL, A.S.; OSBURN, B.I. Detection of bluetongue virus in bovine fetuses using the avidin-biotin complex immunoperoxidase method. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 45-49, 1989.

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.

ARAÚJO JR, J.P.; NOGUEIRA, M.F.; DA CRUZ, T.F.; HAIGH, J.C. Viral Diseases. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. (Eds). **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP, 2010, p. 330-341.

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.

BATH, G.F. Bluetongue. In: **Proceedings of the 2nd International Congress for Sheep Veterinarians**, p. 349-357, 1989.

BENKÖ, M., HARRACH, B. A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. **Archives of Virology**, v. 143, n. 4, p. 829-837, 1998.

BOYCE, W.M.; WOODS, L.W.; KEEL, M.K.; MACLACHLAN, N.J.; PORTER, C.O.; LEHMKUHL, H.D. An epizootic of adenovirus-induced hemorrhagic disease in captive black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 3, p. 370-373, 2000.

BRODIE, S.J.; BARDSLEY, K.D.; DIEM, J.; MECHAM, J.O.; NORELIUS, S.E.; WILSON, W.C. Epizootic hemorrhagic disease: analysis of tissues by amplification and in situ hybridization reveals widespread orbivirus infection at low copy numbers. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 3863-3871, 1998.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; ABREU, J.J.; LAGE, A.P.; FERRAZ, I.B.; LOBATO, Z.I.P.; BALSAMO, S.L. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Tropical Animal Health Production**, v. 24, n. 3, p. 173-176, 1992.

CFSPH. **The Center for Food Security & Public Health**. Diseases caused by the epizootic hemorrhagic disease virus serogroup, 2006. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epizootic_hemorrhagic_disease.pdf>. Acesso em: 20.jun.2012.

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

COOPER, R.J.; YEO, A.C.; BAILEY, A.S.; TULLOS, A.B. Adenovirus Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Conjunctivitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 1, p. 90-95, 1999.

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.

DAVIES, F.G.; MUNGAI, J.N.; PINI, A. A new bluetongue vírus serotype isolated in Kenya. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 25-32, 1992.

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). In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007, p. 641-664.

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. In: XLVII Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária e 1º Encontro Nacional da ABRAVAS. **Anais da XLVII Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária e 1º Encontro Nacional da ABRAVAS**. São Paulo, setembro de 1992.

ECHAVARRIA, M.; FORMAN, M.; TICEHURST, J.; DUMLER, J.S.; CHARACHE, P. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3323-3326, 1998.

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.

GAYDOS, J.K.; DAVIDSON, W.R.; ELVINGER, F.; HOWERTH, E.W.; MURPHY, M.; STALLKNECHT, D.E. Cross-protection between epizootic hemorrhagic disease virus serotypes 1 and 2 in white-tailed deer. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 4, p. 720-728, 2002.

GIBBS, E.P.J.; GREINER, E.C. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. In: MONATH, T.P. (ed). **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Florida: CRC Press, 1989. p. 39-70.

GOULD, E.A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 109-121, 2009.

GOULD, E.A.; HIGGS, S.; BUCKLEY, A.; GRITSUN, T.S. Potential arbovirus emergence and implications for the United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 549-555, 2006.

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.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (eds). **Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference**, 3 ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2005, p. 637-722.

HAIGH, J.C.; MACKINTOSH, C.; GRIFFIN, F. Viral, parasitic and prion diseases of farmed deer and bison. **Revue Scientifique et Technique – Office International Des Epizooties**, v. 21, n. 2, p. 219-248, 2002.

HESS, M.; RAUE, R.; HAFEZ, H.M. PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 81, p. 199-203, 1999.

HOFF, G.L.; TRAINER, D.O. Observations on bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in white-tailed deer. 1. Distribution of virus in the blood. 2. Cross-challenge. **Journal of Wildlife Disease**, v. 10, p. 25-31, 1974.

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.A.; RENZULLO, S.; CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; THUER, B. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1855-1861, 2008.

HORWITZ, M.S. Adenovirus and their application. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**, 2 ed. New York: Raven Press, 1990, p. 1679-1722.

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. **International Union for Conservation of Nature**. Disponível em: <<http://www.iucn.org/>>. Acesso em: 13.jun.2012.

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.

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.

KINCHINGTON, P.R.; TURSE, S.E.; KOWALSKI, R.P.; GORDON, Y.J. Use of polymerase chain amplification reaction for the detection of adenoviruses in ocular swab specimens. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.35, n. 12, p. 4126-4134, 1994.

KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P., PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associação com problemas reprodutivos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia – Uruguaiana**, v. 10, p. 42-51, 2003.

LAGE, A.P.; CASTRO, R.S.; MELO, M.I.; AGUIAR, P.H.; BARRETO FILHO, J.B.; LEITE, R.C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais state, Brazil. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux.**, v. 49, n. 3, p. 195-197, 1996.

LAPOINTE, J.M.; WOODS, L.W.; LEHMKUHL, H.D.; KEEL, M.K.; ROSSITTO, P.V.; SWIFT, P.K.; MACLACHLAN, N.J. Serologic detection of adenoviral hemorrhagic disease in black-tailed deer in California. **Journal of Wildlife Disease**, v. 36, p. 374-377, 2000.

LEHMKUHL, H.D., HOBBS, L.A. Serologic and hexon phylogenetic analysis of ruminant adenoviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 891-897, 2008.

LEHMKUHL, H.D., HOBBS, L.A., WOODS, L.W. Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1187-1196, 2001.

LOBATO, Z.I.P. **Vírus de língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccínia e resposta imune**. 1996. 200f. Tese – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

LÜSCHOW, D.; PRUSAS, C.; LIERZ, M.; GERLACH, H.; SOIKE, D. HAFEZ, H.M. Adenovirus of psittacine birds: investigations on isolation and development of a real-time

polymerase chain reaction for specific detection. **Avian Pathology**, v. 36, n. 6, p. 487-494, 2007.

MACDONALD, N.E. West Nile virus in the context of climate change. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 19, p. 217-218, 2008.

MACLACHLAN, N.J. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. **Veterinaria Italiana**, v. 40, n. 4, p. 462-467, 2004.

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

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

MASSUDA, N.; OHNISHI, T.; KAWAMOTO, S.; MONDEN, M.; OKUBO, K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 22, p. 4436-4443, 1999.

MCKINNEY, M.D.; MOON, S.J.; KULESH, D.A.; LARSEN, T.; SCHOEPP, R.J. Detection of viral RNS from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, p. 39-42, 2009.

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.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, comunicação, 2000.

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

MONATH, T.P.; GUIRAKHOO, F. Orbiviruses and coltivirus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields Virology**, 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p.1735-1766.

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.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. *Adenoviridae*. In: FLORES, E.F. (org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: editora UFSM, 2007, p. 413-431.

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.

MOTA, I.O.; CASTRO, R.S.; ALENCAR, S.P.; LOBATO, Z.I.P.; LIMA FILHO, C.D.F.; ARAÚJO SILVA, T.L.; DUTRA, A.C.T.; NASCIMENTO, S.A. Anticorpos contra vírus do grupo da língua azul em caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco e inferências

sobre sua epidemiologia em regiões semiáridas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1595-1598, 2011.

MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**, 3 ed. California: Academic Press, 1999. 344 p.

NETTLES, V.F.; STALLKNECHT, D.E. History and progress in the study of hemorrhagic disease of deer. **Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference**, v. 57, p. 499-516, 1992.

NOGUEIRA, A.H.C.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; CURCI, V.C.L.M.; CARDOSO, T.C. Detecção de anticorpos contra o vírus da língua azul em ovinos da região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1271-1276, 2009.

NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World**, 6^a ed. vol 2. London: The Johns Hopkins University Press, 1999. 2015 p.

OIE. **Office International des Épizooties**. OIE Terrestrial Manual 2009. Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf>.

Acesso em: 20.jun.2012.

ODFW. **Oregon Department of Fish and Wildlife**. Adenovirus Hemorrhagic Disease of Deer. Disponível em:

<http://www.dfw.state.or.us/wildlife/health_program/andevirus/index.asp>. Acesso em:

18.jun.2012.

ORRÙ, G.; FERRANDO, M.L.; MELONI, M.; LICARDI, M.; SAVINI, G.; SANTIS, P.D. Rapid detection and quantitation of bluetongue virus (BTV) using molecular beacon fluorescent probe assay. **Journal of Virological Methods**, v. 137, p. 34-42, 2006.

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

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.

PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. **Doenças da reprodução em bovinos no Pantanal: ocorrência de animais soropositivos para os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina à vírus e língua azul**. Corumbá: Empraba Pantanal, n. 7, p. 1-7, 1997.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814). In: DUARTE, J.M.B. (Ed.). **Biologia e Conservação dos Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1997.

PINTO, J.; BONACIC, C.; HAMILTON-WEST, C.; ROMERO, J.; LUBROTH, J. Climate change and animal diseases in South America. **Revue Scientifique et Technique – Office International des Épizooties**, v. 27, n. 2, p. 599-613, 2008.

PRASAD, G.; JAIN, N.C.; GUPTA, Y. Bluetongue virus infection in India: a review. **Revue Scientifique et Technique – Office International des Épizooties**, v. 11, n. 3, p. 699-711, 1992.

PRESTWOOD, A.K.T.; KISTNER, T.P.; KELLOGG, F.E.; HAYES, F.A. The 1971 outbreak of hemorrhagic disease among white-tailed deer of the southeastern United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 10, p. 2217-224, 1974.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZHANG, H.; JEFFREY, S.S. RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies. **BMC Molecular Biology**, v. 8, p. 118, 2007.

ROY, P. Orbiviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields Virology**, 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p.1709-1734.

RUSSELL, W.C.; BENKÖ, M. Adenoviruses (Adenoviridae): Animal viruses. In: WEBSTER, R.G.; CRANOFF, A. (eds). **Encyclopaedia of Virology**. London: Academic Press, London, 1999, p. 14-21.

SANCHÉZ-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.

SHI, S.; LIU, C.; PEREZ, J.; TAYLOR, C.R. Protein-embedding technique: a potential approach to standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 53, p. 1167–1170, 2005.

SHILTON, C.M., SMITH, D.A.; WOODS, L.W.; CRAWSHAW, G.J.; LEHMKUHL, H.D. Adenoviral infection in captive moose (*Alces alces*) in Canada. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 1, p. 73-79, 2002.

SHOPE, R.E.; MCNAMARA, L.G.; MANGOLD, R. A virus-induced epizootic hemorrhagic disease of the Virginia white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 111, p. 155-177, 1960.

SORDEN, S.D.; WOODS, L.W.; LEHMKUHL, H.D. Fatal pulmonary edema in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) associated with adenovirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p. 378-380, 2000.

SOUZA, T.S.; COSTA, J.N.; MARTINEZ, P.M.; COSTA NETO, A.O.; PINHEIRO, R.R. Anticorpos contra o vírus da língua azul em rebanhos ovinos da microrregião de Juazeiro, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n. 3, p. 419-427, 2010.

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.

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.

TABACHNICK, W.J. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 23-43, 1996.

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, 1982a, p. 5-9.

THORNE, E.T. Epizootic hemorrhagic disease. In: THORNE, E.T.; KINGSTON, N.; JOLLEY, W.R.; BERGSTROM, R.C. (Eds). **Diseases of Wildlife in Wyoming**. Wyoming Game and Fish Department, Laramie, 1982b, p. 9-10.

VENDITTI, L.L.R. **Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil**. 2009. 77 f. Dissertação – Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

WELLEHAN, J.F.X.; JOHNSON, A.J.; HARRACH, B.; BENKÖ, M.; PRESSIER, A.P.; JOHNSON, C.M.; GARNER, M.M.; CHILDRESS, A.; JACOBSON, E.R. Detection and Analysis of Six Lizard Adenoviruses by Consensus Primer PCR Provides Further Evidence of a Reptilian Origin for the Atadenoviruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 23, p. 13366–13369, 2004.

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

WOODS, L.W. Adenoviral Diseases. In: WILLIAMS, E.S., BARKER, I.K. (Eds), **Infectious Diseases of Wild Mammals**, 3 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2001. p. 202-212.

WOODS, L.W.; HANLEY, R.S.; CHIU, BURD, M.; NORDHAUSEN, R.W.; STILIAN, M.H.; SWIFT, P.K. Experimental adenovirus hemorrhagic disease in yearling black-tailed deer. **Journal of Wildlife Disease**, v. 33, n. 4, p. 801-811, 1997.

WOODS, L.W.; HANLEY, R.S.; CHIU, P.H.; LEHMKUHL, H.D.; NORDHAUSEN, R.W.; STILIAN, M.H.; SWIFT, P.K. Lesions and transmission of experimental adenovirus hemorrhagic disease in black-tailed deer fawns. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 2, p. 100-110, 1999.

WOODS, L.W.; LEHMKUHL, H.D.; HOBBS, L.A.; PARKER, J.C.; MANZER, M. Evaluation of the pathogenic potential of cervid adenovirus in calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 33-37, 2008.

WOODS, L.W.; LEHMKUHL, H.D.; SWIFT, P.K.; CHIU, P.H.; HANLEY, R.S.; NORDHAUSEN, R.W.; STILLIAN, M.H.; DREW, M.L. Experimental adenovirus hemorrhagic disease in white-tailed deer fawns. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n.1, p. 153-158, 2001.

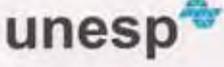
WOODS, L.W.; SWIFT, P.K.; BARR, B.C.; HORZINEK, M.C.; NORDHAUSEN, R.W.; STILLIAN, M.H.; PARRON, J.F.; OLIVER, M.N.; JONES, K.R.; MACLACHLAN, N.J. Systemic adenovirus infection associated with high mortality in mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 125-132, 1996.

ZAKHARTCHOUK, A.; BOUT, A.; WOODS, L.W.; LEHMKUHL, H.D.; HAVENGA, M.J.E. *Odocoileus hemionus* deer adenovirus is related to the members of *Atadenovirus* genus. **Archives of Virology**, v. 147, p. 841-847, 2002.

ZELL, R.; KRUMBHOLZ, A.; WUTZLER, P. Impact of global warming on viral diseases: what is the evidence? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 652-660, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Aprovação do presente trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

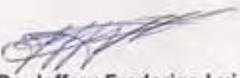
 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal 

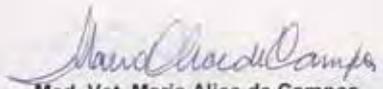
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009908/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo retrospectivo de agentes virais em cervídeos brasileiros de vida livre e de cativeiro**", sob a responsabilidade da Profª Drª Karin Werther, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de Maio de 2011.

Jaboticabal, 13 de Maio de 2011.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alico de Campos
Secretária - CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n - CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2800 - fax 16 3202 4276 - www.fca.vunesp.br

APÊNDICE B. Autorização concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade para coleta e exportação de material de cervídeos brasileiros (fixados em formalina e emblocados em parafina).



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: 26519-1	Data da Emissão: 11/02/2011 12:06
------------------------	--

Dados do titular

Nome: Karin Werther	CPF: 532.920.309-00
Título do Projeto: Estudo retrospectivo de agentes virais em cervídeos brasileiros da vida livre e de cativeiro	
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 material biológico de animais que vem a óbito	01/2011	12/2011
2	Transporte de bloco de parafina para USA	01/2011	12/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

- 1 As atividades de campo exercidas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, sendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passiva de, utilizados por meio de registros e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
- 2 Esta autorização NÃO exerce o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, nem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor 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 IBAMA nº 154/2007 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.licenci.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES) e pelo CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
- 5 O titular de licença ou autorização e os membros de 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 condições in situ.
- 6 Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componentes do patrimônio genético existente no território nacional, na modalidade convencional e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
- 7 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.
- 8 As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreespeciadas ou ameaçadas de sobreespeciação.

Outras ressalvas

- 1 O planejamento e execução das atividades de contenção (física e química) e de coleta de material biológico em cativeiro são de responsabilidade da equipe técnica do mantenedor e devem ser acordadas previamente com os executores do projeto.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Alinei Kawasumi	pesquisadora e mantenedora	326.770.618-13	284615685 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JABOTICABAL	SP	Jaboticabal	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mazama americana, Mazama boroni, Mazama nasoi, Mazama gouazoubira, Blastocerus dibutimus

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 16789855



Página 1/3



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: 26519-1	Data da Emissão: 11/02/2011 12:06
Dados do titular	
Nome: karin werther	CPF: 532.920.309-00
Título do Projeto: Estudo retrospectivo de agentes virais em cervídeos brasileiros de vida livre e de cativeiro	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão
---	--	---------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	criadouro científico

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 16789855



Página 2/3

APÊNDICE C. Dados dos cervídeos que apresentaram lesões macro e/ou microscópicas sugestivas de doenças hemorrágicas virais.

Nº Silvestres/ RG Patologia	Espécie	VL/C (origem)	Sexo	Idade	Observações
1 90/94 11029	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	M	S/i	SC: anorexia, letargia, edema na cabeça e lesões na boca. Macro: espuma em traqueia, petéquias em epicárdio. Micro: lesões hemorrágicas generalizadas.
2 60/95 11496	<i>M. nana</i>	C (NUPECCE)	M	adulto	SC: apatia, hiporexia. Macro: conteúdo intestinal hemorrágico, hidropericardio, petéquias no endocárdio e na serosa de estômagos. Micro: glossite, congestão em rim e pulmão.
3 67/95 11584	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: edema facial, prostração, lesões na boca. Macro: fígado, rim e pulmão congestos, petéquias em endocárdio. Micro: glossite, congestão em pulmão e fígado, hemorragia em fibras cardíacas.
4 142/95 12077	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	M	jovem	SC: sem informações. Macro: petéquias em endocárdio, traqueia hiperêmica, enterite hemorrágica. Micro: áreas de hemorragia em mucosa de abomaso e intestino, fígado congesto.
5 04/96 12111	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: edema submandibular, lesões na boca, magro, anorexia, recém-parida. Macro: petéquias em endocárdio, fígado e pulmão congestos, mucosa intestinal hemorrágica. Micro: pneumonia intersticial e abomaso com hemorragia e infiltrado inflamatório.
6 71/96 12355	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	M	adulto	SC: magro, apesar de alimentar-se bem, prostração e em seguida óbito. Macro: petéquias em língua, endocárdio e estômagos, edema pulmonar. Micro hemorragia em miocárdio e mucosa intestinal.
7 77/96 12375	<i>M. nemorivaga</i>	C (NUPECCE)	F	S/i	SC: hiporexia, emaciação. Macro: fígado e pulmão congestos, conteúdo intestinal hemorrágico. Micro: hemorragia em submucosa intestinal, autólise em fígado, congestão em pulmão e rim.

Continua

Nº Silvestres/ RG Patologia	Espécie	Origem VL/C	Sexo	Idade	Observações
8 102/96 12462	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: edema submandibular. Macro: hemotórax, petéquias em língua e endocárdio, intestino com conteúdo hemorrágico. Micro: hemorragia em pulmão e rim, degeneração em fígado e rim, infiltrado inflamatório em baço.
9 150/96 12689	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: diarreia há 60 dias, apetite normal, emaciação. Macro: mucosa intestinal escurecida, pulmão e fígado congestos. Micro: enterite, degeneração tubular, congestão em fígado.
10 26/97 13370	<i>M. bororo</i>	C (NUPECCE)	M	adulto	SC: edema de face e língua, sangue nas fezes. Macro: petéquias em endocárdio, enterite hemorrágica, mucosa de abomaso hiperêmica. Micro: infiltrado inflamatório em rim.
11 75/00 17043	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	adulto	SC: recém-parida, apatia, magreza, vômitos, abortos. Macro: pericardite, enterite hemorrágica, mucosa de abomaso hiperêmica. Micro: degeneração em fígado e músculo, infiltrado inflamatório em intestino.
12 79/00 17065	<i>M. gouazoubira</i>	C (Zoológico)	M	adulto	SC: emaciação, lesão na língua, sialorreia, prostrado. Macro: edema e congestão pulmonar, petéquias em endocárdio, perda do epitélio da língua, úlceras em duodeno.
13 31/01 18087	<i>M. gouazoubira</i>	C (NUPECCE)	M	jovem	SC: anorexia, lesões na boca. Macro: conteúdo intestinal sanguinolento, edema pulmonar, petéquias em endocárdio, mucosa de rúmen e abomaso hiperêmicas. Micro: congestão em rim, pulmão, intestino e abomaso, infiltrado inflamatório em fígado e rim.
14 01/02 19323	<i>B. dichotomus</i>	C (NUPECCE)	M	jovem	SC: decúbito lateral seguido de óbito. Macro: conteúdo intestinal hemorrágico, sufusões em mucosas dos estômagos, petéquias em endocárdio. Micro: congestão em pulmão e traqueia, hemorragia em miocárdio.

Continua

Nº Silvestres/ RG Patologia	Espécie	Origem VL/C	Sexo	Idade	Observações
15 215/03 22362	<i>B. dichotomus</i>	C (NUPECCE)	F	jovem	SC: sem informações. Macro: úlcera na língua e rúmen, linfonodos aumentados. Micro: infiltrado inflamatório em pulmão, fígado e baço, hemorragia em rim.
16 38/05 24144	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	M	jovem	SC: apatia, sialorreia, anorexia, lesões em cavidade oral. Macro: enterite hemorrágica, lesões na língua, mucosas dos estômagos hiperêmicas. Micro: congestão e enfisema em pulmão.
17 40/05 24146	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	jovem	SC: apatia, lesões na boca, dificuldade para se alimentar. Macro: lesões ulcerativas em cavidade oral, enterite hemorrágica. Micro: infiltrado inflamatório em estômagos, intestino, pulmão com enfisema e células inflamatórias.
18 43/05 24185	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	M	adulto	SC: hiporexia, sialorreia. Macro: mucosa oral e dos estômagos hiperêmica, língua enegrecida, conteúdo intestinal sanguinolento. Micro: infiltrado inflamatório em língua, omaso e abomaso, edema pulmonar.
19 80/05 24343	<i>M. nana</i>	C (NUPECCE)	M	adulto	SC: edema submandibular. Macro: hidropericárdio, sufusões em endocárdio, mucosa do abomaso hiperêmica. Micro: hemorragia entre fibras cardíacas, fígado e pulmão congestos.
20 154/05 24817	<i>B. dichotomus</i>	C (Zoológico)	F	adulto	SC: ferida em membro torácico esquerdo, mantida em caixa de transporte, hiporexia. Macro: petéquias em língua, edema pulmonar, hemopericárdio. Micro: pulmão congesto, fígado com degeneração gordurosa.
21 73/06 25702	<i>M. gouzoubira</i>	VL (Ribeirão Preto)	M	S/i	SC: amputação de membro torácico esquerdo. Macro: músculo branco, pulmão e fígado hemorrágicos, conteúdo intestinal hemorrágico.

Continua

Nº Silvestres/ RG Patologia	Espécie	Origem VL/C	Sexo	Idade	Observações
22 74/06 25704	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	jovem	SC: apatia, sialorreia, diarreia, decúbito lateral. Macro: úlceras e petéquias na língua, conteúdo sanguinolento em estômagos e intestinos, petéquias em endocárdio. Micro: necrose e hemorragia em língua, infiltrado inflamatório em fígado.
23 75/06 25705	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	adulto	SC: dificuldade para comer, sialorreia. Macro: enterite hemorrágica, lesões em palato duro. Micro: infiltrado inflamatório em língua, intestino e pulmão,
24 77/06 25708	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	adulto	SC: hiporexia há 1 mês, emaciação, decúbito. Macro: necrose em gengiva, líquido com sangue em cavidade torácica e abdominal. Micro: edema pulmonar, fígado e omaso autolisados.
25 79/06 25706	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	jovem	SC: anorexia, apatia, sialorreia. Macro: petéquias em cavidade oral, endocárdio e pericárdio, enterite hemorrágica. Micro: hemorragia em língua, infiltrado inflamatório em intestino e língua.
26 51/07 27206	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	adulto	SC: apatia, lesões na boca, dificuldade respiratória, fezes pastosas. Macro: enterite hemorrágica, hiperemia em mucosas dos estômagos, hepatomegalia. Micro: congestão em pulmão, baço e fígado, infiltrado inflamatório em língua e retículo.
27 52/07 27207	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	M	adulto	SC: hiporexia, diarreia, apatia, dificuldade para comer. Macro: cavidade oral arroxeadada, enterite hemorrágica, hemotórax, esplenomegalia. Micro: autólise em órgãos.
28 53/07 27208	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	M	jovem	SC: sialorreia, hiporexia, lesões na boca, diarreia. Macro: enterite hemorrágica, líquido sanguinolento em cavidade torácica e abdominal. Micro: pneumonia severa, degeneração em fibras cardíacas.

Continua

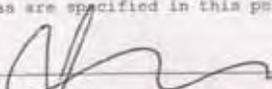
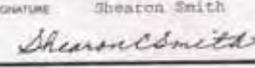
Nº Silvestres/ RG Patologia	Espécie	Origem VL/C	Sexo	Idade	Observações
29 54/07 27209	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	jovem	SC: sialorreia, anorexia, apatia. Macro: petéquias na mucosa oral, enterite hemorrágica, líquido sanguinolento em cavidades torácica e abdominal, mucosas hiperêmicas dos estômagos.
30 55/07 27210	<i>B. dichotomus</i>	C (CCCP)	F	filhote	SC: dificuldade para mamar, apático, fezes com sangue. Macro: enterite hemorrágica. Micro: infiltrado inflamatório em intestino, bactérias em pulmão.
31 146/07 28027	<i>M. gouazoubira</i>	VL (Luis Antônio)	F	adulto	SC: escoriações, fraturas de dentes, úlcera na língua, exposição de falanges. Macro: úlcera em língua, músculo branco em membros.
32 206/07 28303	<i>M. gouazoubira</i>	VL (Ibitinga)	F	adulto	SC: escoriações em membros e cabeça devido ataque por cães, magra. Macro: pulmões hemorrágicos, conteúdo intestinal hemorrágico.
33 07/08 28425	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: trauma em contenção, anorexia, animal prenhe. Macro: placas diftéricas na língua, edema em pulmão.
34 115/08 28828	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	F	jovem	SC: apatia, hiporexia após soltura em piquete, fezes pastosas. Macro: conteúdo intestinal sanguinolento, mucosa do abomaso hiperêmica.
35 118/08 28852	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	F	jovem	SC: apatia, hiporexia após soltura em piquete. Macro: intestino com conteúdo sanguinolento, papilas ruminais avermelhadas.
36 120/08 28860	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	M	jovem	SC: hiporexia após soltura em piquete. Macro: hemotórax, hemoperitônio, conteúdo intestinal sanguinolento. Micro: congestão em rim, traqueia e pulmão, infiltrado inflamatório em fígado.
37 173/08 29191	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	M	adulto	SC: hiporexia há 12 dias, edema submandibular, decúbito seguido de óbito. Macro: petéquias na língua e coração, conteúdo intestinal sanguinolento, petéquias em endocárdio.
38 205/08 29395	<i>M. nana</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: encontrado morto. Macro: sufusões e úlceras na língua, úlceras na mucosa do abomaso.

Continua

Nº Silvestres/ RG Patologia	Espécie	Origem VL/C	Sexo	Idade	Observações
39 03/09 29766	<i>B. dichotomus</i>	C (NUPECCE)	F	filhote	SC: junto da mãe, ainda mamava, decúbito lateral. Macro: úlceras na língua, petéquias em coração, conteúdo intestinal sanguinolento, úlcera em abomaso.
40 04/09 29771	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: anorexia, lesões na língua, decúbito lateral seguido de óbito. Macro: petéquias em língua e endocárdio, enterite hemorrágica, hiperemia em mucosa de estômagos.
41 15/09 30278	<i>M.americana</i>	C (NUPECCE)	F	adulto	SC: prostrado, dificuldade respiratória, diarreia. Macro: petéquias no endocárdio, fígado com manchas esbranquiçadas, mucosa do omaso e abomaso hiperêmicas, intestino com conteúdo sanguinolento.
42 225/10 32252	<i>M. americana</i>	C (NUPECCE)	M	adulto	Encontrado morto, em autólise. Macro: conteúdo intestinal avermelhado.

Legenda: VL = vida livre, C = cativo, F = fêmea, M = macho, SC = sinais clínicos, S/i = sem informação, Macro = macroscopia, Micro = microscopia, NUPECCE = Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – Unesp/Jaboticabal, CCCP = Centro de Conservação de Cervo-do-Pantanal – Promissão/SP.

APÊNDICE D. Autorização do Governo Americano para entrada de materiais de cervídeos brasileiros (fixados em formalina e emblocados em parafina).

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE VETERINARY SERVICES BETHESDA, MARYLAND 20815		PERMIT NUMBER 46591 Research
UNITED STATES VETERINARY PERMIT FOR IMPORTATION AND TRANSPORTATION OF CONTROLLED MATERIALS AND ORGANISMS AND VECTORS		DATE ISSUED 06/29/2010
		DATE EXPIRES 06/29/2011
NAME AND ADDRESS OF SHIPPER(S) Various shippers outside the UNITED STATES		CC: AVIG, MS, CA (Sacramento, CA)
NAME AND ADDRESS OF PERMITTEE INCLUDING ZIP CODE AND TELEPHONE NUMBER Francisco A. Uzal University of California, Davis CA Animal Health and Food Safety Laboratory 105 W. Central Avenue San Bernardino, California 92409 909-383-4287		U.S. PORT(S) OF ARRIVAL AS APPLICABLE
		MODE OF TRANSPORTATION AIR
AS REQUESTED BY YOUR APPLICATION, YOU ARE AUTHORIZED TO IMPORT OR TRANSPORT THE FOLLOWING MATERIALS		
Formalin fixed tissues/biopsies (may be embedded in paraffin) from mammals, birds, or reptiles (diagnostic samples)		
RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS FOR TRANSPORTING AND HANDLING MATERIALS AND ALL DERIVATIVES		
THIS PERMIT IS ISSUED UNDER AUTHORITY CONTAINED IN A CFR CHAPTER 1 PARTS 84 AND 132. THE AUTHORIZED MATERIALS OR THEIR DERIVATIVES SHALL BE USED ONLY IN ACCORDANCE WITH THE RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS SPECIFIED BELOW. ALTERATIONS OF RESTRICTIONS CAN BE MADE ONLY WHEN AUTHORIZED BY USDA. 49 CFR 171.10		
<ul style="list-style-type: none"> o Adequate safety precautions shall be maintained during shipment and handling to prevent dissemination of disease. o *** THIS PERMIT IS INVALID WITHOUT PERMITTEE'S SIGNATURE ***. *I, Francisco A. Uzal, certify that this material will be used in accordance with all restrictions and precautions as are specified in this permit,*** o *** signed:  : * *** o ***Each shipment shall be accompanied by an ORIGINAL signed document from the producer/manufacture confirming that the tissues must be sliced to no more than 1 cm. thick and immersed in a 10 percent solution of formalin equivalent to at least 10 times the volume of the tissues. The solution of formalin must be changed at least twice, at weekly intervals, before shipment to the United States [This certification must CLEARLY correspond to the shipment by means of an invoice number or shipping marks or lot number or other identification method. The USDA import permit number must be written on the certificate. An English translation must be provided.] o Importer is responsible for obtaining any required authorization from the Department of Interior, U.S. Fish and Wildlife Service at: ((703) 358-2104). o This permit DOES NOT authorize direct or indirect exposure of or inoculation into laboratory and domestic animals, including poultry, cattle, sheep, swine, horses, etc. Work shall be limited to IN VITRO uses only. 		
continued on subsequent page(s).....		
TO EXPEDITE CLEARANCES AT THE PORT OF ENTRY, BILL OF LADING, AIRBILL OR OTHER DOCUMENTS ACCOMPANYING THE SHIPMENT SHALL BEAR THE PERMIT NUMBER		
SIGNATURE 	TITLE National Center - Import - Export	NO LABEL
VS FORM 16-6A (MAR 95)		Replaces VS Form 16-3A and 16-28 which are obsolete
		Page 1 of 2

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
APHIS / VETERINARY SERVICES, RIVERDALE, MARYLAND 20737.
ATTACH TO U.S. VETERINARY PERMIT - 46591

RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS: (continued from Permit Form VS 16-6)

- o Packaging, containers, and all equipment in contact with these materials shall be sterilized or considered a biohazard and be disposed of accordingly.
 - o On completion of your work, all permitted materials and all derivatives therefrom shall be destroyed.
 - o This permit is valid only for work conducted or directed by you or your designee in your present U.S. facilities. (MATERIALS SHALL NOT BE MOVED TO ANOTHER U.S. LOCATION, OR DISTRIBUTED WITHIN THE U.S., WITHOUT USDA, APHIS, VS, NCIE AUTHORIZATION.)
 - o The restrictions on this permit remain in force as long as the material is in the United States.
 - o This permit does not exempt the permittee from responsibility for compliance with any other applicable federal, state, or local laws and regulations.
 - o ANY VIOLATION OF THE CONDITIONS OF THIS PERMIT MAY RESULT IN CANCELLATION OF THE PERMIT.
 - o A copy of this permit must be included with the shipping documents. For imported materials, these documents must be presented to CBP Agricultural Specialists upon arrival at the U.S. port of entry.
-

APÊNDICE E. Resultados da detecção dos vírus da Língua azul e Doença epizootica hemorrágica em cervídeos brasileiros utilizando RT-PCR em tempo real, realizados no laboratório do CAHFS (California Animal Health and Food Safety).

	California Animal Health & Food Safety Laboratory System PO Box 1770 Davis, CA 95617 (530) 752-8700	Addendum Version 1 <i>This report supersedes all previous reports for this case</i>	CAHFS Case #: D1111433 Referral #: Date Collected: Date Received: 11/03/2011 Case Coordinator: Leslie Woods, DVM, PhD, DACVP Electronically Signed and Authorized By: Woods, Leslie on 5/16/2012 9:27:04AM	
	Mail To: Kawanami (2010/14787, Aline Eyko) UNESP-FCAV, Depto Patologia Veterinaria Jaboticabal- Sao Paulo, Jaboticabal-Sao Paulo 1488	Collection Site: CAHFS W HEALTH SCIENCES DR Davis, CA 95617		
Specimens Received: 42 Tissue Block.				
Case Contacts				
Other WOODS, LESLIE Submitter Kawanami (2010/14787, Aline Eyko)	530-752-8746 UNESP-FCAV, Depto Patologia Veterinaria Via De Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, S/n Jaboticabal- Sao Paulo, Jaboticabal-Sao Paulo 14884-900	CVDLS - PATHOLOGY DAVIS, CA 95617		
Specimen Details				
ID	ID Type	Taxonomy	Gender	Age
1	CAHFS Internal ID	Bovine		
Laboratory Findings/Diagnosis				
12-07-11. Three blocks were positive for Bluetongue virus by RT-PCR.				
Biotechnology				
Bluetongue Virus RNA qRT PCR (tissue)				
Animal/Source	Specimen	Specimen Type	Results	
1	(1) 11029k	Tissue Block	Negative	
1	(2) 11496kb	Tissue Block	Negative	
1	(3) 11584kb	Tissue Block	Negative	
1	(4) 12077k	Tissue Block	Negative	
1	(5) 12111K	Tissue Block	Negative	
1	(6) 12355k	Tissue Block	Negative	
1	(7) 12375ka	Tissue Block	Negative	
1	(8) 12462k	Tissue Block	Positive	
1	(9) 12689k	Tissue Block	Negative	
1	(10) 13370k	Tissue Block	Negative	
Report 4.4-CAHFS Standard Report - 5/15/2012				
Page 1 of 5				

Continua

CAHFS Addendum Version 1	Accession # D1111433	May 16, 2012
1	(11) 17043k Tissue Block	Negative
1	(12) 17065k Tissue Block	Negative
1	(13) 18087ka Tissue Block	Positive
1	(14) 19323kb Tissue Block	Indeterminate
1	(15) 22362ka Tissue Block	Indeterminate
1	(16) 24144kb Tissue Block	Indeterminate
1	(17) 24146k Tissue Block	Negative
1	(18) 24185kb Tissue Block	Negative
1	(19) 24343k Tissue Block	Negative
1	(20) 24817k Tissue Block	Negative
1	(21) 25702k Tissue Block	Negative
1	(22) 25704ka Tissue Block	Indeterminate
1	(23) 25705ka Tissue Block	Negative
1	(24) 25706kb Tissue Block	Negative
1	(25) 25708kb Tissue Block	Negative
1	(26) 27206ka Tissue Block	Negative
1	(27) 27207kc Tissue Block	Negative
1	(28) 27208k Tissue Block	Negative
1	(29) 27209ka Tissue Block	Negative
1	(30) 27210ka Tissue Block	Negative
1	(31) 28027kb Tissue Block	Negative
1	(32) 28303k Tissue Block	Negative
1	(33) 28425ka Tissue Block	Negative
1	(34) 28826k Tissue Block	Negative
1	(35) 28852kb Tissue Block	Negative
1	(36) 28860k Tissue Block	Positive

Continua

CAHFS Addendum Version 1		Accession # D1111433		May 16, 2012
1	(37) 29191kb	Tissue Block		Negative
1	(38) 29395k	Tissue Block		Negative
1	(39) 29766k	Tissue Block		Negative
1	(40) 29771k	Tissue Block		Negative
1	(41) 30278k	Tissue Block		Negative
1	(42) 32252k	Tissue Block		Negative
Davis Gene Sequencing				
Animal/Source	Specimen	Specimen Type		Results
1	(8) 12462k	Tissue Block		BTV
1	(13) 18087ka	Tissue Block		BTV
1	(14) 19323kb	Tissue Block		BTV
1	(15) 22362ka	Tissue Block		BTV
1	(16) 24144kb	Tissue Block		BTV
1	(22) 25704ka	Tissue Block		BTV
1	(36) 28860k	Tissue Block		BTV
Epizootic Hemorrhagic Disease Virus RNA rtPCR (Under validation)				
Animal/Source	Specimen	Specimen Type		Results
1	(1) 11029k	Tissue Block		Negative
1	(2) 11496kb	Tissue Block		Negative
1	(3) 11584kb	Tissue Block		Negative
1	(4) 12077k	Tissue Block		Negative
1	(5) 12111K	Tissue Block		Negative
1	(6) 12356k	Tissue Block		Negative
1	(7) 12375ka	Tissue Block		Negative
1	(8) 12462k	Tissue Block		Negative
1	(9) 12689k	Tissue Block		Negative
1	(10) 13370k	Tissue Block		Negative
1	(11) 17043k	Tissue Block		Negative

CAHFS Addendum Version 1	Accession # D1111433	May 16, 2012	
1	(12) 17065k	Tissue Block	Negative
1	(13) 18087ka	Tissue Block	Negative
1	(14) 19323kb	Tissue Block	Negative
1	(15) 22362ka	Tissue Block	Negative
1	(16) 24144kb	Tissue Block	Negative
1	(17) 24146k	Tissue Block	Negative
1	(18) 24185kb	Tissue Block	Negative
1	(19) 24343k	Tissue Block	Negative
1	(20) 24817k	Tissue Block	Negative
1	(21) 25702k	Tissue Block	Negative
1	(22) 25704ka	Tissue Block	Negative
1	(23) 25705ka	Tissue Block	Negative
1	(24) 25706kb	Tissue Block	Negative
1	(25) 25708kb	Tissue Block	Negative
1	(26) 27206ka	Tissue Block	Negative
1	(27) 27207kc	Tissue Block	Negative
1	(28) 27208k	Tissue Block	Negative
1	(29) 27209ka	Tissue Block	Negative
1	(30) 27210ka	Tissue Block	Negative
1	(31) 28027kb	Tissue Block	Negative
1	(32) 28303k	Tissue Block	Negative
1	(33) 28425ka	Tissue Block	Negative
1	(34) 28828k	Tissue Block	Negative
1	(35) 28852kb	Tissue Block	Negative
1	(36) 28860k	Tissue Block	Negative
1	(37) 29191kb	Tissue Block	Negative

Continua

CAHFS Addendum Version	Accession #			
1	(38) 29395k	Tissue Block		Negative
1	(39) 29766k	Tissue Block		Negative
1	(40) 29771k	Tissue Block		Negative
1	(41) 30278k	Tissue Block		Negative
1	(42) 32252k	Tissue Block		Negative

Report 4.4-CAHFS Standard Report - 5/15/2012

Page 5 of 5