

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**

Mariana Andrioli Pinheiro

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA  
EM CERVÍDEOS BRASILEIROS.**

//

Belo Horizonte

2019

Mariana Andrioli Pinheiro

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA  
EM CERVÍDEOS BRASILEIROS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Isabel  
Maldonado Guedes

Dra. Ana Carolina Diniz Matos

Belo Horizonte

2019

P654d Pinheiro, Mariana Andrioli, 1993 -  
Diagnóstico Laboratorial de doença hemorrágica epizootica em cervídeos  
brasileiros/ Mariana Andrioli Pinheiro. – 2019.  
145f.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Coorientadoras: Ana Carolina Diniz Matos

Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da  
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência  
Animal.

Inclui Bibliografia.

1. Cervídeo – Doenças - Teses - 2. Medicina Veterinária - Teses -  
I. Lobato, Zélia Inês Portela – II. Matos, Ana Carolina Diniz – III. Guedes,  
Maria Isabel Maldonado Coelho - IV. Universidade Federal de Minas  
Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**MARIANA ANDRIOLI PINHEIRO**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA .

Aprovada em 08 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



---

Prof<sup>ª</sup>. Zélia Inês Portela Lobato  
Presidente - Orientador



---

Prof<sup>ª</sup>. Michelle de Paula Gabardo  
Instituto Federal de Minas Gerais - IFMG



---

Prof<sup>ª</sup>. Érica Azevedo Costa  
Escola de Veterinária - UFMG



Dedico este trabalho aos animais, minha família, professoras e amigos que me apoiaram e foram meu porto seguro perante as dificuldades durante este percurso.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar e por trazer tantas oportunidades e boas pessoas ao meu lado.

Aos animais que foram o objetivo e fundamentais na realização desse trabalho ser grandioso.

Aos meus pais, Alice e Rizaldo, por sempre me apoiarem e estarem comigo nos melhores e piores momentos. Vocês sempre serão os meus maiores exemplos a serem seguidos. Graças aos seus apoios e por sempre confiarem na minha capacidade me fortaleceram a lutar para eu fazer o melhor de mim e alcançar os meus sonhos. Assim, quem sou hoje devo a vocês. Obrigada pelo carinho, amor incondicional e por serem meu porto seguro! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Caio e Gabriel, que me ofereceram muito apoio, amor e carinho mesmo distantes. Amo está com vocês mesmo nas brigas comuns de irmãos kkk

Aos meus outros familiares pelo incentivo e força por tudo que faço, e principalmente, ao amor sincero e acolhedor.

À minha orientadora, professora Zélia, por ter me recebido de braços abertos no laboratório e me incluído na “família LPVA”. Agradeço por todos os ensinamentos, atenção e orientações, você tem me acrescentado muito todos os dias. Você é meu grande exemplo de mulher, professora e pesquisadora. Não tenho palavras de quanto sou grata a você. Muito obrigada!!

À professora Bel, outro exemplo a ser seguido. Agradeço por sempre está disposta a ajudar e por ter me ensinado muito. Pessoa com um coração enorme, muito inteligente e supercompetente.

À professora Erikita, também por ser outro exemplo de pessoa e pesquisadora. Obrigada pelos ótimos momentos de gargalhadas, conversas e aprendizagem.

Aos professores Herman e Alexandra pelo apoio e atenção tanto na conjugação dos pontos quânticos quanto para tirar qualquer dúvida que tive sobre o assunto.

Ao professor Chico por todo carinho, atenção e conversas muito gostosas! Você sempre me incentivou bastante no meu trabalho e escrita.

Ao professor Jenner por todos os ensinamentos, carinho, atenção e conversas. Foi muito divertido e proveitoso a festa do Retrolab e espero repetir mais momentos assim.

À Carol, por todos os ensinamentos, paciência, pelas broncas contruticas e pelo carinho. Obrigada por está sempre presente e me ajudado em tudo que podia com muita dedicação. Você é uma guerreira e pesquisadora nata que desejo muito sucesso.

À Gra, pelo grande apoio, carinho e altos bate-papos com gargalhadas. Obrigada pelo apoio incondicional e por estar sempre presente para ajudar.

À Sandra, por toda atenção, carinho, paciência e por me ajudar muito no experimento. Sem você não seria possível ter visualizado os famosos quantum dots kkk Obrigada por tudo.

À todos os técnicos, Rita, Eduardo e Agda, às faxineiras, aos porteiros, Robson e André, as técnicas da patologia, Leimar, Valéria e Natália, por todo empenho com alegria que fazem pela universidade e por sempre dispostos a me ajudar com muito carinho e dedicação.

Aos meus companheiros e amigos das lutas do mestrado, Aninha e Marco Túlio, por todo apoio, conversas descontraidas e paciência. Obrigada por toda parceria, pela alegria, pelo companheirismo e por todas as conquistas árduas que conseguimos, sem vocês este mestrado não seria o mesmo. Agradeço em especial ao Marquinho, meu irmão acadêmico, por todas nossas macerações, companheirismo, lutas sem fim no fluxo, gargalhadas e confiança. Você foi um grande presente que tive nesses tempos, que me deu muit força, e espero que nossa união untrapasse deparamentos e dure tempos.

À Ailinha, minha grande companheira dos fins de semanas kkk Obrigada por toda paciência, amor, carinho e ensinamentos. Você sempre estava disposta a me ajudar e ouvir meus desabafos absurdos. Amei ter te conhecido e pelos vários momentos divertidos e inesquecíveis.

Aos meus queridos companheiros do laboratório de virologia animal, Isabelle, Fabinha, Barbara, Brenda, Eduardo, Alessandra, Livia, Stella, Keith, Daniel, por todo carinho. Conviver e trabalhar com vocês é muito divertido e prazeroso.

À todos os meus amigos e companheiros da pós-graduação, pelas ajuda em disponibilizar os equipamentos e o espaço dentro de seus laboratórios. Obrigada pelas conversas, apoio, carinho e lutas conquistadas com a união de todos. Obrigada por tudo.

Á minha grande irmã de coração, “Sasa”, por todos os desabafos e aventuras que jamais serão esquecidas. Agradeço muito pelo apoio, broncas, confiança e amor. Sei que muitas vezes minha convivência foi difícil pelo meu pessimismo, mas você sempre me fez ver o melhor de mim. Obrigada por tudo e que tenhamos mais anos de luta e diversão juntas minha vaca amada.

Aos meus amigos “exclusivos”, que desde o início da minha faculdade, têm me apoiado e sendo verdadeiros amigos. Sou muito sortuda por ter vocês e pelos maravilhosos momentos juntos.

À banca avaliadora por toda atenção e pelas sugestões construtivas ao trabalho.

À instituição de fomento CAPES, por viabilizar financeiramente a realização do experimento.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser,  
mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

## RESUMO

Entre as principais causas de mortalidade em cervídeos estão as doenças hemorrágicas, que contribuem para o estado de perigo de extinção de algumas espécies de cervos. Entre elas, o vírus da doença hemorrágica epizootica (EHDV) e o vírus da língua azul (BTV) causam perdas significativas nas populações de cervídeos brasileiros em cativeiro. O objetivo deste estudo foi padronizar e avaliar as técnicas de imunofluorescência, imunohistoquímica e RT-qPCR para detecção do EHDV em culturas de células ou em tecidos parafinizados de cervídeos brasileiros que vieram a óbito devido à doença hemorrágica. Foi produzido soro hiperimune em duas coelhas a partir de quatro inoculações com EHDV sorotipo 2 (EHDV-2). Os soros dos animais foram testados pelo método de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e soroneutralização até atingirem o título de anticorpos desejados. Foram coletados fragmentos de vários órgãos de nove cervos que morreram com doença hemorrágica aguda em 2017. A infecção por EHDV foi confirmada, pela técnica de RT-qPCR, em seis animais, um *Blastocerus dichotomus* e cinco *Mazama nana*. Em seguida, os fragmentos de tecidos dos cervos positivos foram processados para análise histopatológica. Posteriormente, o soro hiperimune produzido foi purificado e utilizado para padronização da imunohistoquímica (IHQ) utilizando a técnica da Streptavidina conjugada. Os órgãos utilizados para essa técnica foram baço, pulmão, linfonodo, fígado, rim e testículos. Os mesmos anticorpos foram bioconjugados com pontos quânticos (QDs) e utilizados no teste de imunofluorescência direta em cultura de células infectadas com EHDV-2. Os tecidos parafinizados foram submetidos a dois métodos de extração de material genético e, em seguida, foi realizado o RT-qPCR das amostras. Na avaliação histopatológica, as principais alterações observadas foram hiperemia, hemorragia, edema e infiltrado inflamatório, predominantemente linfoplasmocitário agudo. Utilizando o teste de IHQ padronizado foi possível detectar EHDV nos tecidos estudados, sendo que em linfócitos, macrófagos e células endoteliais e epiteliais foi observada a maior intensidade de imunomarcção. A imunofluorescência direta utilizando os QDs também foi eficaz na identificação de células infectadas com vírus. Com relação aos protocolos de extração de RNA, ambos apresentaram valores de

Ct que variaram de 36 a 39, nas amostras positivas sendo, portanto, superiores aos encontrados quando o material genético foi extraído dos mesmos tecidos frescos e onde foram registrados CTs menores de 30. Assim, na padronização e avaliação das técnicas de diagnóstico, a IHQ demonstrou ser uma técnica eficiente para detecção do vírus em tecidos parafinizados, sendo importante em estudos retrospectivos e de patogenia da doença hemorrágica epizootica. A imunofluorescência direta utilizando os QDs é uma alternativa promissora no diagnóstico da infecção por EHDV. Os protocolos de extração de RNA em material parafinado, na maioria das amostras, demonstraram resultados inferiores no tecido fresco, provavelmente em consequência à degradação do ácido nucleico que ocorre devido à etapa de fixação em formol, comprometendo, portanto, os resultados da RT-qPCR.

**Palavras-chaves:** vírus da doença hemorrágica epizootica; cervídeo; imunohistoquímica, imunofluorescência; RT-qPCR.

## ABSTRACT

Among the main causes of mortality in cervids is hemorrhagic disease, which contributes to the endangered state of some deer species. Among them, epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) and bluetongue virus (BTV) have caused significant losses in Brazilian cervid populations. The objective of this study was to standardize and implement the immunofluorescence, immunohistochemistry and RT-qPCR techniques for detection of EHDV in cell cultures or paraffin tissues of Brazilian cervids that died with hemorrhagic disease. Hyperimmune serum was produced in two rabbits after four inoculations with EHDV serotype 2 (EHDV-2). The sera of the animals were tested by agar gel immunodiffusion (IDGA) and serum neutralization until they reached the desired antibody titre. Fragments of several organs of nine deer that died with acute hemorrhagic disease in 2017 were collected. The EHDV infection was confirmed by the RT-qPCR technique in six animals, one *Blastocerus dichotomus* and five *Mazama nana*. Then, tissue fragments from positive deer were processed for histopathological analysis. Subsequently, hyperimmune serum produced was purified and used to standardize the immunohistochemistry (IHC) using Streptavidin conjugated technique. The organs used for this technique were spleen, lung, lymph node, liver, kidney and testicle. The same antibodies were bioconjugated with quantum dots (QDs) and used in a direct immunofluorescence technique in culture of cells infected with EHDV-2. The paraffinized tissues were subjected to two methods of extraction of genetic material and then performed the RT-qPCR of the samples was performed. In the histopathological evaluation, the main alterations observed were hyperemia, hemorrhage, edema and inflammatory infiltrate, predominantly acute lymphoplasmocytary. Using the standardized IHQ test, it was possible detect EHDV in the studied tissues, with lymphocytes, macrophages, endothelial and epithelial cells being observed to be more immunostaining. Direct immunofluorescence using the QDs was also effective in identifying viral infected cells. In relation to the RNA extraction protocols, both presented Ct values that ranged from 36 to 39, in the positive samples, therefore being higher than

those found when the genetic material was extracted from the same fresh tissues and where CTs under 30 were recorded. Thus, in the standardization and implementation of the diagnosis techniques, IHC has been shown to be an efficient technique for detecting the virus in paraffin-embedded tissues, being important in further retrospective and pathogenesis studies of epizootic haemorrhagic disease. Direct immunofluorescence using QDs is a promising alternative in the diagnosis of EHDV infection. The RNA extraction protocols in paraffin, in most samples, demonstrated inferior results in fresh tissue, probably as a result of degradation of nucleic acid that occurs due to the formaldehyde fixation step, thus compromising the results of the RT-qPCR.

**Keywords:** virus of epizootic haemorrhagic disease; deer; immunohistochemistry; immunofluorescence; RT-qPCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 -	Registros de ocorrência e área de distribuição geográfica de <i>Blastocerus dichotomus</i>	20
Figura 2 -	Registros de ocorrência e área de distribuição geográfica de <i>Mazama nana</i>	20
Figura 3 -	Morfologia do vírus da língua Azul	22
Figura 4 -	Eletroforese em gel do agarose 1% para dsRNAs de BTV e de EHDV	23
Figura 5 -	Isolamento e identificação de Orbivírus em ruminantes domésticos e silvestres na América do Sul	25
Figura 6 -	Esquema da patogenia do vírus da doença hemorrágica epizootica (EHDV) em cervídeos	28
Figura 7 -	Achados macroscópicos e microscópicos de cervos de cauda branca experimentalmente infectados com o vírus da doença hemorrágica epizootica sorotipo 6 que vieram ao óbito	30
Figura 8 -	Principais técnicas de imuno-histoquímica	33
Figura 9 -	Esquema de coleta de sangue e inoculação dos coelhos para produção do soro hiperimune	40
Figura 10 -	Eletroforese em gel de agarose 1% para dsRNA do antígeno viral. L: 100 pb DNA ladder (Promega, Madison, EUA). 1: Amostra viral do pool de 1200 mL	47
Figura 11 -	Imunodifusão em Gel de Ágar para o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) na coelha 02 no dia 71 após aplicação do inóculo. Ag: Antígeno de EHDV purificado	48
Figura 12 -	Perfil da produção de anticorpos contra o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV-2) nas coelhas imunizadas para produção de soro hiperimune. AN: Anticorpos neutralizantes. ADC: Adjuvante completo de Freud. AIC: Adjuvante Incompleto de Freud	49

Figura 13 -	Histopatologia das principais lesões encontradas em cervídeos infectados com EHDV	55
Figura 14 -	Histopatologia das principais lesões encontradas em cervídeos infectados com EHDV	56
Figura 15 -	Histopatologia das principais lesões encontradas em cervídeos infectados com EHDV	57
Figura 16 -	Imuno-histoquímica para o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) em cervídeos que vieram a óbito por hemorragia sistêmica, em 2017	62
Figura 17 -	Imuno-histoquímica para o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) em cervídeos que vieram a óbito por hemorragia sistêmica, em 2017	63
Figura 18 -	Imuno-histoquímica para o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) em cervídeos que vieram a óbito por hemorragia sistêmica, em 2017	64
Figura 19 -	Microscopia de fluorescência (Microscópio Leica DMIL) de cultivo de células BHK-21 infectadas com o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV)	66
Figura 20 -	Microscopia pelo Eclipse Ti microscópio confocal (Nikon Instruments, EUA) do cultivo de células VERO infectadas por 18 horas com o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) utilizando anti-EHDV-2 bioconjugados com pontos quânticos CdS (core-shell CdS-ZnS)	67
Figura 21 -	Microscopia pelo Eclipse Ti microscópio confocal (Nikon Instruments, EUA) do cultivo de células VERO infectadas por 18 horas com o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) utilizando anti-EHDV bioconjugados com pontos quânticos ZAIS (core-shell AgInS <sub>2</sub> -ZnS)	68
Figura 22 -	Resultados do CT no RT-qPCR em ordem crescente das amostras de cervídeos positivos para o vírus da Doença Epizoótica	71

Hemorrágica (EHDV) pela extração no órgão fresco e com os respectivos tecidos parafinizado extraídos usando o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation da Ivtrogen e pelo método do Trizol® da Invitrogen™ (Califórnia, EUA)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição e caracterização das amostras formalizadas de tecidos dos cervídeos que vieram a óbito em 2017, em Foz de Iguaçu-PR	42
Tabela 2 -	Primers utilizados no RT-qPCR para identificação do EHDV e BTV e o número de acesso do GenBank das seqüências-alvo	43
Tabela 3 -	Classificação em escores da intensidade de marcação de anticorpo anti-EHDV na imuno-histoquímica	44
Tabela 4 -	Titulação do sobrenadante viral nas várias etapas de produção e purificação do antígeno	48
Tabela 5 -	Resultados de Imunodifusão em Gel de Ágar para o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica nas coelhas imunizadas para produção de soro hiperimune	48
Tabela 6 -	Avaliação da intensidade das principais alterações histopatológicas em órgãos coletados de cervídeos que vieram a óbito em 2017 e positivos no RT-qPCR para EHDV	51
Tabela 7 -	Órgãos em que foram observadas alterações histopatológicas de animais positivos para EHDV no RT-qPCR	52
Tabela 8 -	Avaliação das marcações pela imuno-histoquímica de todos os cervídeos que vieram a óbito em 2017 e positivos para EHDV e correlacionando com os valores de limiar (Ct) de ciclo de cada órgão	59
Tabela 9 -	Resultados do CT no RT-qPCR das amostras de cervídeos positivos para o vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) pela extração no órgão fresco e parafinizado usando o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation da Invitrogen e pelo método do Trizol® da Invitrogen™ (Califórnia, EUA) e resultados da imuno-histoquímica com os respectivos grau de marcação de cada tecido	70

Tabela 10 - Valores estimados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e índice Kappa para o RT-qPCR de amostras parafinadas extraídas pelo kit e trizol em relação ao órgão fresco 71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
ACF	Adjuvante de Freud Completo
AcN	Anticorpo neutralizante
ACTB	$\beta$ -actina
AEC	Cromógeno 3-Amino-9-ethylcarbazole
AGE	Gel de agarose
AHSV	<i>African horse sickness virus</i>
AIF	Adjuvante de Freud Incompleto
BHK-21	Célula de rim de hamster recém-nascido
BSA	Albumina bovina
BTV	Vírus da língua azul
CASIB	Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
CdS	QDs core-shell CdS-ZnS
C-ELISA	<i>Complement-enzyme linked immuno sorbent assay</i>
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CID	Coagulação intravenosa disseminada
Cm	Centímetro
CT	Valores de limiar de ciclo
DHA	Doença hemorrágica por adenovírus
DHE	Doença hemorrágica epizoótica
DMF	N,N-dimetilformamida (DMF)
DMVP	Departamento de Preventiva de Medicina Veterinária
dNTP's	Nucleotídeos
dsRNA	RNA de fita dupla
ECE	Ovos de galinha embrionados
ECP	Efeito citopático visível

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEV	Vírus da encefalose eqüina
EHDV	Vírus da doença hemorrágica epizoótica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA	Estados Unidos da America
FCM	Febre catarral maligna
FFPE	Fixados em formol e embebidos em parafina
g	Gramma
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HE	Hematoxilina e eosina
HKG	<i>Housekeeping</i>
IBMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IFA	Imunofluorescência
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IFN- $\beta$	Interferon beta
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LA	Doença da língua azul
LAPCOM	Laboratório de Patologia Comparada da Vida de Silvestres
LPVA	Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal
LSAB	Streptavidina-biotina marcada
KC	Células de <i>Culicoides sonorensis</i>
Kg	Quilograma
M	Molar
MEM	Meio essencial mínimo

min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NEC	Número da necropsia
nm	Nanômetro
NS	Proteína viral não estrutural
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS-T	Tampão fosfato-salina com Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial Hidrogeniônico
PL	Fotoluminescência
qPCR	PCR em tempo real
QDs	Pontos quânticos
RA	Recuperação antigênica
RT	Transcrição reversa
SDS	Sodium dodecyl sulfato
Seg	Segmento
SFB	Soro fetal bovino
SN	Soroneutralização
ssRNA	RNA de fita simples
TCID <sub>50</sub>	<i>Tissue cell infective dose 50%</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHE	Usina Hidroelétrica
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo

USP	Universidade de São Paulo
UV	Radiação ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VERO	Células de rim de macaco verde africano
VP	Proteína viral estrutural
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZAIS	QDs core-shell AgInS <sub>2</sub> -ZnS
ZOO	Zoológico Roberto Ribas Lange

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>30</b>
2.1 Cervídeos.....	30
2.2 Reovírus.....	33
2.2.1 Orbivírus.....	33
2.2.1.1 Epidemiologia.....	37
2.2.1.2 Orbivírus no Brasil .....	38
2.3 Doença hemorrágica epizootica .....	43
2.3.1 Patogenia.....	44
2.3.2 Sinais clínicos.....	46
2.3.3 Lesões macro e microscópicas.....	47
2.3.4 Diagnóstico.....	50
2.3.4.1 Imuno-histoquímica.....	52
2.3.4.2 Imunofluorescência .....	55
2.3.4.2.1 Quantum dots (qds).....	56
2.3.4.3 RT-PCR .....	58
2.3.5 Controle e prevenção .....	61
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>62</b>
3.1 Objetivo geral.....	62
3.2 Objetivos específicos.....	62
<b>4 MATERIAL E METODOLOGIA.....</b>	<b>63</b>
4.1 Local do experimento .....	63
4.2 Produção do soro hiperimune.....	63

4.2.1	Amostra viral .....	63
4.2.2	Produção da suspensão viral .....	64
4.2.3	Purificação do vírus .....	65
4.2.4	Produção do inóculo.....	65
4.2.5	Titulação viral .....	66
4.2.6	Inoculação, acompanhamento e coleta de amostras .....	66
4.2.7	Testes sorológicos .....	67
4.2.8	Purificação de IgG anti-EHDV-2 .....	68
4.3	Amostras dos tecidos de cervídeos.....	69
4.4	Processamento das amostras para imuno-histoquímica e histopatologia.....	73
4.5	Padronização da imuno-histoquímica.....	74
4.5.1	Controles utilizados na imuno-histoquímica .....	76
4.6	Imunofluorescência .....	76
4.6.1	Imunofluorescência direta com pontos quânticos (QDs).....	76
4.7	Reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-qPCR) em amostras parafinizadas 78	
4.7.1	Extração do RNA.....	78
4.7.2	RT-PCR em tempo real.....	79
4.8	Análise dos dados.....	79
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
5.1	Produção do soro hiperimune.....	80
5.1.1	Caracterização da amostra viral .....	80
5.1.2	Produção do antígeno .....	80
5.1.3	Produção do inóculo e soro hiperimune.....	81
5.1.4	Purificação de anticorpos IgG .....	84

5.2 Amostras dos cervídeos e avaliação histopatológica.....	84
<b>5.3 Imuno-histoquímica .....</b>	<b>96</b>
5.4 Imunofluorescência .....	106
5.5 Extração de material genético em tecido parafinado.....	111
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>133</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família *Reoviridae* apresenta duas subfamílias, *Sedoreovirinae* e *Spinareovirinae*, com 15 gêneros no total, e é constituída por vírus RNA com simetria icosaédrica e não envelopados. Dentre os gêneros, os *Orbivirus* e *Rotavirus* possuem espécies virais de grande importância em medicina veterinária. O *Orbivirus* são arbovírus que possuem 22 espécies já registradas que afetam uma variedade de vertebrados, incluindo ruminantes domésticos e selvagens (Alfieri et al., 2017; ICTV, 2018).

Das espécies de orbivírus de importância na veterinária, cita-se o vírus da língua azul (*Bluetongue virus*, BTV) que possui 27 sorotipos e o vírus da doença hemorrágica epizootica (EHDV), com sete sorotipos (Attoui and Mohd, 2015; Maclachlan et al., 2015; ICTV, 2018). O BTV é o protótipo do gênero *Orbivirus*, sendo amplamente estudado e caracterizado, enquanto o EHDV, mesmo necessitando de mais estudos, assemelha-se muito ao BTV em vários aspectos estruturais e na patogenia viral (Alfieri et al., 2017; ICTV, 2018).

O BTV e EHDV causam doenças em ruminantes domésticos e selvagens, que de acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), são de notificação obrigatória e, assim, devem ser rapidamente diagnosticadas e reportadas (Stallknecht e Howerth, 2004; OIE, 2017). A incidência destes vírus pode acarretar embargo de trânsito de animais, bem como de seus produtos, além de causar perdas econômicas e o risco de extinção de animais silvestres (Duarte et al., 2012; OIE, 2017).

O EHDV é responsável por causar a doença hemorrágica epizootica (DHE) a qual é não contagiosa, mas muito infecciosa, tendo sido o seu primeiro relato em Nova Jersey, nos Estados Unidos, em 1955, afetando várias espécies de cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) (Shope et al., 1960). Este vírus acomete ruminantes, sendo os cervídeos mais gravemente afetados, resultando em altos níveis de mortalidade, variando de 62 a 90%, associados a febre alta, letargia, edema, anorexia, fraqueza, dispneia, edema acentuado na cabeça e hemorragia generalizada em todos os órgãos (Prestwood et al., 1974; Maclachlan et al., 2015; CFSPH, 2016). Bovinos geralmente são assintomáticos e considerados como um hospedeiro reservatório do vírus (Gibbs e Lawman, 1977).

O BTV e EHDV são arbovírus transmitidos por dípteros do gênero *Culicoides*, que atuam como vetores biológicos. Assim, a doença ocorre de forma sazonal, principalmente nos períodos quentes e chuvosos, devido ao crescimento da população dos insetos vetores (Stallknecht e Howerth, 2004). A América do Sul tem ótimas condições climáticas para o desenvolvimento e proliferação de *Culicoides spp.*, conseqüentemente apresenta muitas áreas endêmicas para LA e DHE. Através de testes sorológicos em ruminantes domésticos e silvestres, demonstram que o BTV está presente e amplamente distribuído desde 1978 em todo o continente, enquanto o EHDV foi somente identificado em animais com sorologia positiva a partir de 1984 na Guiana (Lobato et al., 2015).

No Brasil, já foram identificadas oito espécies de cervídeos, das quais duas, *Blastocerus dichotomus* e *Mazama nana*, são consideradas ameaçadas de extinção e estão na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (*International Union for Conservation of Nature - IUCN*) (Duarte et al., 2015; Duarte et al., 2016). Uma das causas de extinção destes animais é a introdução de doenças de bovinos, como a língua azul (LA) e a DHE (Blouch et al., 1998; Navas-Suárez et al., 2018). Essas duas enfermidades, têm acometido populações de cervídeos brasileiros em cativeiro, acarretando significativas perdas destes cervos (Arita et al., 1997; Kawanami, 2014).

Em contraste ao BTV, o EHDV apresenta maior morbidade e mortalidade entre ruminantes selvagens do que em ruminantes domésticos. Assim, o EHDV tem impacto na preservação dos cervídeos, pois pode reduzir drasticamente a população desses animais em uma determinada área (Maclachlan et al., 2015).

Somente a partir da década de 90, ocorreram os primeiros relatos de cervídeos no Brasil com sinais clínicos e lesões muito sugestivas de doenças hemorrágicas no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), no estado do Paraná (Arita et al., 1997; Duarte et al., 2012). O CASIB tem o intuito de proporcionar a reprodução em cativeiro e preservar as espécies de cervídeos. Contudo dois anos após o início do programa, em 1990, teve-se o primeiro relato de indivíduos da espécie *Mazama nana* vindo ao óbito com sinais de hemorragia sistêmica e generalizada. (Duarte et al., 2012). Desde então, anualmente vários animais vêm ao óbito, porém não é realizado o

diagnóstico devido e o agente etiológico envolvido não é identificado (Duarte et al., 2012). A partir de 2015, amostras destes cervídeos foram enviados ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) da escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram realizados os devidos diagnósticos. Assim, foi identificado de diferentes sorotipos de BTV (BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22) que acometiam os cervos no criadouro (Baldini et al., 2018).

Outros estudos têm identificado cervídeos brasileiros com sorologia positiva para o vírus da DHE. Tendo o primeiro levantamento sorológico, em 1999, realizado em 22 cervídeos *B. dichotomus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul e revelaram que 74% dos animais eram soropositivos para EHDV, 88% soropositivos para BTV e 60% soropositivos para ambos os vírus (Pandolfi, 1999).

Em 2008, houve o primeiro isolamento de EHDV no Brasil em cervídeos da espécie *Mazama nana* que vieram ao óbito por doença hemorrágica no zoológico Pomerode em Santa Catarina, sendo o diagnóstico realizado pelo grupo de pesquisa do LPVA da UFMG (Favero et al., 2013).

Considerando que cervídeos acometidos pelas DHE e LA apresentam sinais clínicos e lesões semelhantes e indistinguíveis (Fischer et al., 1995), é necessário o diagnóstico laboratorial para identificação do agente etiológico (Wilson et al., 2015). Assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico eficientes para identificação e posterior notificação dos orbivírus tanto para estudos de prevalência quanto de controle da LA e DHE.

As amostras de tecidos coletadas de animais, fixadas com formol e emblocadas com parafina podem ser utilizados com o intuito de diagnosticar doenças infecciosas e para estudos retrospectivos. Comumente, os blocos de parafina são fonte de estudos histopatológicos, sendo as principais lesões de EHDV referentes aos danos endoteliais causados pelo agente (Cubas et al., 2014; Alfieri et al, 2017). Contudo, não há nenhuma avaliação histológica e nem aplicação de outro método de diagnóstico referente ao tecido, como imuno-histoquímica, de cervídeos brasileiros que vieram ao óbito por DHE, sendo necessários para o melhor entendimento da patogenia deste vírus em espécies brasileiras.

Os avanços tecnológicos e diagnósticos dos últimos tempos ampliaram a utilização dos blocos de parafina referentes a área de biologia molecular, possibilitando a extração do material genético (Yang et al., 2006; Simonato et al., 2007). Assim, constitui uma ferramenta para ser desenvolvida e utilizada em estudos retrospectivos de cervídeos que vieram ao óbito com doença hemorrágica e que não tinham sido realizados os devidos testes para identificação do agente etiológico.

Este trabalho é o primeiro a realizar estudos sobre as lesões histopatológicas de cervídeos brasileiros infectados com EHDV associando com testes de diagnóstico de imuno-histoquímica e RT-PCR em tempo real. Os dados desta pesquisa vão possibilitar um maior entendimento da patogenia e estudos retrospectivos do vírus da DHE em cervídeos brasileiros e qual o melhor método a ser utilizado para diagnóstico em tecidos já parafinados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cervídeos

Os cervídeos são ruminantes ungulados que possuem chifres e são membros da família *Cervidae*, composta por 18 gêneros e 56 espécies, as quais estão distribuídas por toda a América do Norte, América do Sul, Eurásia e no norte da África (Cubas et al., 2014; IUCN, 2018).

O Brasil é um dos países com a maior diversidade de cervídeos no mundo, tendo oito espécies já reconhecidas: *Blastocerus dichotomus*, *Mazama nemorivaga*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. americana*, *M. bororo*, *Odocoileus virginianus* e *Ozotoceros bezoarticus* (Duarte et al., 2012). Destas, *Blastocerus dichotomus* e *Mazama nana* são consideradas ameaçadas de extinção nacional e classificadas como “vulneráveis” na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (*International Union for Conservation of Nature - IUCN*) (Duarte et al., 2015; Duarte et al., 2016).

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) também conhecido como suaçuetê, suaçupu, ou guaçuçuçu, é o único representante do gênero *Blastocerus*, sendo a maior espécie de cervídeo da América do Sul e um dos maiores mamíferos brasileiros. Nesta espécie, os machos podem pesar cerca de 130 Kg e as fêmeas até 100 Kg, e ter até 1,27 metros na altura da cernelha. Apresentam grandes chifres ramificados que chegam a possuir até doze pontas, conforme sua idade e o nível de sua alimentação (Duarte, 1996).

Estes animais vêm rapidamente desaparecendo de sua área de distribuição original e, como resultado, sua população encontra-se bastante reduzida e fragmentada (Pinder, 1995). Assim, as maiores concentrações de *Blastocerus dichotomus* são encontradas no pantanal brasileiro (estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), na região da Ilha do Bananal, área do Araguaia (estados de Mato Grosso e Tocantins), no rio Guaporé (estado de Rondônia), nas várzeas do rio Paraná (estados de Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo), na região do Jalapão (Tocantins, Piauí e Maranhão), no Parque Nacional Grande



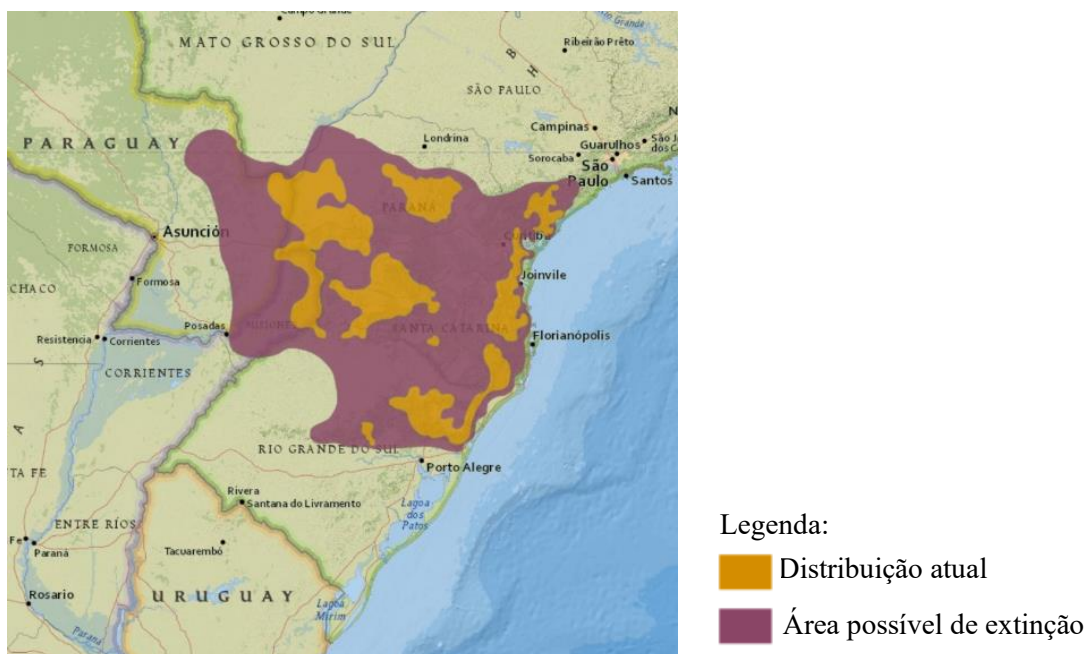


Figura 2: Registros de ocorrência e área de distribuição geográfica de *Mazama nana*.  
Fonte: Duarte et al., 2015.

O processo de extinção destas espécies e a redução da sua área de distribuição original se devem a várias e complexas razões, dentre elas: o avanço das fronteiras agrícolas e urbanas, o que tem afetado bastante os remanescentes florestais; doenças introduzidas por bovinos, como língua azul, febre aftosa, brucelose, e diversas endoparasitoses; atividades predatórias de caça; traumas por: veículos em rodovias, ataques de cães domésticos que possuem acesso irrestrito às áreas florestais, ou auto-induzidos devido a brigas entre si ou estresse (Blouch et al., 1998; Navas-Suárez et al., 2018).

Existem poucos estudos sobre a incidência de doenças e seus efeitos nas populações destes cervídeos, mas possivelmente as doenças têm implicação importante na redução destas espécies no último século. As enfermidades virais e bacterianas, introduzidas por bovinos ou por outros ungulados domésticos, têm causado significativas perdas em populações de cativeiro, tanto de *B. dichotomus* quanto de *M. nana*, além de ter causado grandes implicações socioeconômicas (Duarte, 2001; Duarte et al., 2012). Os exemplos incluem: febre aftosa (Moniwa et al, 2012); língua azul (LA) (López-Olvera et al, 2010; Baldini et al., 2018); diarreia viral bovina (BVD) (Raizman et al, 2009); febre

catarral maligna (FCM) (Driemeier et al, 2002) brucelose (Miller et al, 2013); e endo e ectoparasitas (Szaboâ et al., 2007; Duarte et al., 2012; Suárez et al., 2018).

Entre as principais causas de mortalidade em cervídeos estão as doenças hemorrágicas virais. Dentre elas, três causam sintomas clinicamente indistinguíveis: doença da língua azul (LA), doença hemorrágica epizootica (DHE) e doença hemorrágica por adenovírus (DHA) (Cubas et al., 2014; Maclachlan et al., 2015). Dessas, a LA e a DHE têm gerado significativas perdas em populações de cervídeos brasileiros em cativeiro, enquanto a DHA ainda não foi identificada no Brasil (Arita et al., 1997; Kawanami, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), a LA e a DHE são consideradas doenças de notificação obrigatória e, assim, devem ser diagnosticadas rapidamente e comunicadas (OIE, 2017).

## 2.2 Reovírus

A família *Reoviridae* apresenta duas subfamílias, *Sedoreovirinae* e *Spinareovirinae*, com 15 gêneros no total. São vírus que apresentam simetria icosaédrica, ausência de envelope glicoproteico e possuem um genoma constituído por RNA de fita dupla (dsRNA) segmentado (Mertens et al., 2005; ICTV, 2019).

Dos reovírus, os vírus pertencentes aos gêneros *Orbivirus* e *Rotavirus*, subfamília *Sedoreovirinae*, são de grande importância em medicina veterinária por ocasionarem doenças com graves sinais clínicos e por suas características epidemiológicas (Alfieri et al, 2017).

### 2.2.1 Orbivírus

Os *Orbivirus* receberam este nome pela forma de rosca dos seus capsômeros (*Orbi*, em latim, significa anel) (Mertens et al., 2005). Apresentam 22 espécies conhecidas que infectam uma variedade de vertebrados, incluindo ruminantes domésticos e selvagens (ICTV, 2019).

Dentre as espécies de orbivírus de importância na veterinária, incluem-se o vírus da língua azul (*Bluetongue virus*, BTV) que possui 27 sorotipos conhecidos; o vírus da doença hemorrágica epizootica (EHDV), com sete sorotipos; o vírus da peste equina (African horse sickness virus, AHSV), com nove sorotipos; o vírus da encefalose equina (EEV), com sete sorotipos; e o vírus Palyam (Attoui and Mohd, 2015; Jenckel et al., 2015; Maclachlan et al., 2015; ICTV, 2019). Estas três últimas enfermidades ainda não foram relatadas no Brasil e são descritas somente nos continentes africano e asiático.

Nos orbivírus, os vírions maduros medem aproximadamente 80 nm de diâmetro e as proteínas que formam a partícula viral estão dispostas em camadas concêntricas formando um capsídeo interno e externo com simetria icosaédrica (Alfieri et al, 2017). Apresentam um genoma composto por dsRNA de 10 segmentos (Seg-1 ao Seg-10) com aproximadamente 19000 pares de bases. Os segmentos genômicos codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e quatro proteínas não-estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3a e NS4) (Schwartz-Cornil et al,2008; Ratinier et al., 2011).

O BTV é o protótipo do gênero *Orbivirus*, sendo amplamente estudado e caracterizado, enquanto o EHDV, apesar de se assemelhar ao BTV em vários aspectos morfológicos e quanto na patogenia, alguns fatores tanto estruturais, quanto moleculares ainda não foram detalhadamente descritos (Figura 3). Ambos, o capsídeo externo é composto pelas proteínas VP2 e VP5, menos conservadas, sendo a VP2 a responsável por estimular a produção de anticorpos neutralizantes, pela hemaglutinação e pela ligação ao receptor da célula alvo. Portanto, é a principal imunodeterminante do sorotipo dos vírus (Grimes et. al. 1998; Hassan and Roy, 2009). O núcleo interno dos vírions é composto por duas camadas constituídas por cinco proteínas (VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7). Dentre elas, as mais abundantes são as VP3 e VP7. Enquanto no interior do subnúcleo, que envolve o genoma do vírus, estão presentes, em pequenas quantidades, as proteínas VP1, VP4 e VP6. As proteínas não estruturais são produzidas durante a replicação viral e são altamente conservadas (Maan, 2008; Ratinier et. al. 2011).

Os orbivírus apresentam um genoma segmentado, contudo cada espécie vai apresentar variação no peso molecular de cada segmento. O BTV e EHDV, apresentam um dsRNA que na corrida de eletroforese difere de outras espécies do mesmo gênero,

mas são semelhantes entre si (Figura 4). O padrão dos segmentos de EHDV e BTV consiste na migração de 3-3-4 (3-3-3-1), contudo o vírus da língua azul apresenta as bandas do Seg-7 e Seg-8 bem mais separadas que as do vírus da DHE que são indistinguíveis (Maan et al., 2007; Anthony et al., 2009; Belaganahalli et al., 2013).

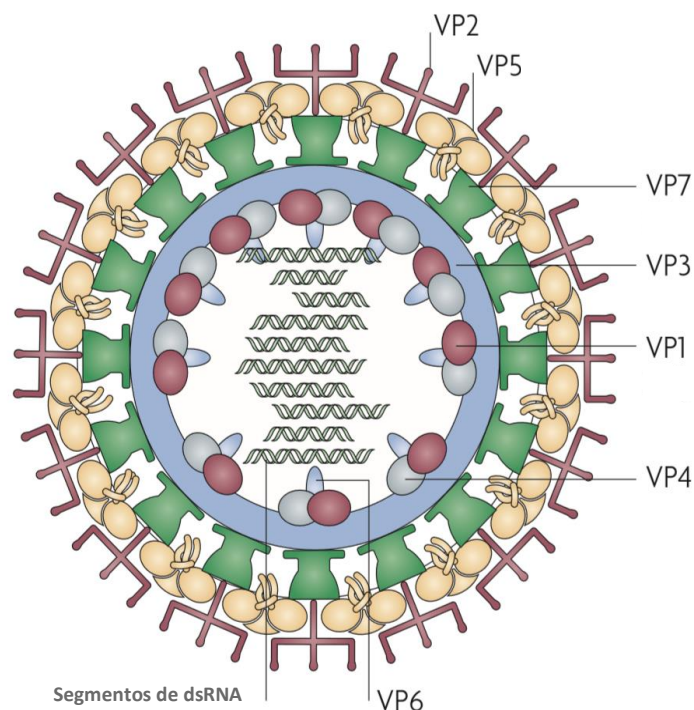


Figura 3: Morfologia do vírus da língua Azul. A partícula viral do BTV é composta por um genoma de RNA fita dupla (dsRNA) dividido em dez segmentos, sendo que cada um codifica uma proteína do vírus. O material genético é circundado por três camadas concêntricas de proteínas. A camada externa é formada pelas proteínas VP2 e VP5 e são responsáveis pela ligação dos receptores da célula alvo. Depois, vem uma camada formada por VP7, uma proteína trimérica. Enquanto, o genoma viral é circundado por uma camada interna de proteínas icosaédricas (VP3). Na superfície interna desta camada estão formados um complexo de três proteínas, a RNA polimerase dependente de RNA (VP1), enzima de cobertura (VP4) e a helicase viral (VP6).  
Fonte: Adaptação de Roy et al., 2009.

Nos orbivírus, tanto BTV quanto EHDV, devido à natureza dos genomas segmentados e, dependendo da compatibilidade genética, podem sofrer reassortimento de seus genes durante co-infecções nas mesmas células infectadas. Esse evento pode envolver vírus de um mesmo sorotipo ou diferentes sorotipos. Assim, o “reassortment” é um fenômeno comum e generalizado que, em uma escala de tempo de apenas algumas

décadas, pode causar grande impacto na composição genômica das amostras de BTV como já observado em estudos na Europa (Nomikou et. al. 2015). Esse evento é um dos responsáveis, juntamente com a mutação, pela diversidade genética de múltiplos sorotipos diferentes nos orbivirus (Alfieri, et. al. 2017).

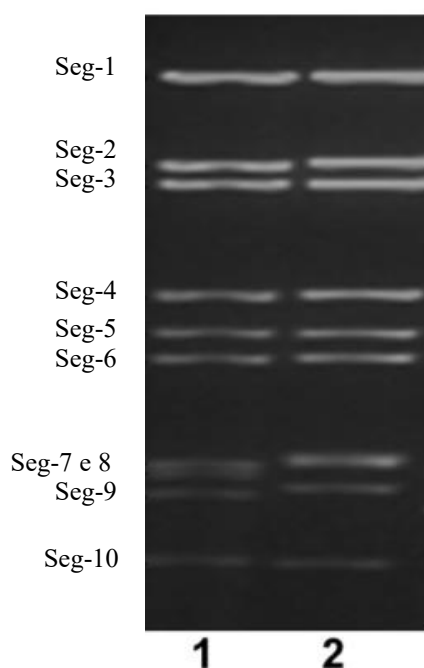


Figura 4: Eletroforese em gel do agarose 1% para dsRNAs de BTV e de EHDV. 1 - O RNA purificado de BTV sorotipo 1; 2 - O RNA purificado de EHDV sorotipo 8. Seg: Segmento. Fonte: Belaganahalli et al., 2013.

Os sorotipos apresentam variação antigênica e virulência entre si que vão influenciar em patogenia e sinais clínicos similares e até distintos nos mesmos hospedeiros, sendo já elucidado que até exibem diferentes padrões de tropismo tecidual e fetal. Além disso, o sorotipo pode estimular proteção cruzada com os do mesmo sorogrupo, sendo bem elucidado em reações cruzadas nos testes sorológicos, mas em outro grupo diferente geralmente haverá pouca ou nenhuma proteção humoral (Batten, et al. 2008; Mellor et al., 2009). Assim, a doença pode ocorrer após a introdução de animais virêmicos infectados com sorotipos exóticos na área, em que os outros hospedeiros mesmo soropositivos para orbivirus serão susceptíveis por não possuir proteção imune cruzada (Alfieri et al., 2017).

### 2.2.1.1 Epidemiologia

No início do século XIX, a doença de língua azul já era bastante conhecida na África do Sul por criadores de animais, sendo denominada de “febre catarral das ovelhas” ou “febre catarral malárica”. Contudo, as primeiras descrições detalhadas da enfermidade em ovinos foram relatadas por Hutcheon (1902). A LA por muito tempo foi considerada restrita ao continente, sendo relatado em vários países, e enquanto naqueles ainda não identificados é considerado como área enzoótica da doença (Mellor et al., 2009).

Mesmo o LA ser de origem africana, atualmente a enfermidade é considerada como uma doença infecciosa distribuída em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Assim, o BTV tem sido relatado também na Europa, Oriente Médio, Austrália, Pacífico Sul, Estados Unidos, Américas do Norte e do Sul e em algumas regiões da Ásia (Mellor et al., 2009; Ostlund, 2015). Na América do Sul, os únicos países que isolaram o BTV de animais infectados foram Brasil, Argentina, Guiana Francesa e Equador (Lager et al., 2004; Viarouge et al., 2014; Lobato et al., 2015; Verdezoto et al., 2017).

A infecção pelo EHDV está amplamente distribuída pelo mundo, sendo já relatada e presente na Austrália (Weir et al., 1997), Ásia (Shirafuji et al., 2017), Europa (Eschbaumer et al., 2012), países africanos (Lee et al. 1974; Cêtre-Sossah et al., 2014) e na América (Stevens et al. 2015). Na América do Norte, a infecção é considerada, junto com a língua azul, a doença mais importante dos cervídeos, sendo já isolados os sorotipos 1, 2 e 6 de EHDV (Ostlund, 2015). Na Austrália, foi isolado os sorotipos 1, 2, 5, 6, 7 e 8; os sorotipos 1, 4 e 6 foram identificados na África; no Oriente Médio ocorreram surtos pelos sorotipos 6 e 7, enquanto os sorotipos 2, 5, 6 e 7 foram identificados na Ásia (CFSPH, 2016; Shirafuji et al., 2017). Na América do Sul, já foram identificados animais soropositivos para o vírus, sendo que na Guiana Francesa conseguiu-se isolar o EHDV-1 e EHDV-6 (Viarouge et al., 2014) e no Equador foi identificado e também isolado EHDV-1 em bovinos assintomáticos (Verdezoto et al., 2017). Na Argentina, ainda não foi relatada DHE, contudo o BTV sorotipo 4, já foi detectado e isolado de rebanhos sentinelas (Lager et al., 2004).

Outras espécies de orbivírus, como o AHSV, o EEV e o vírus Palyam, tem sido somente identificado e relatado nos continentes africano e asiático (Attoui and Mohd, 2015; Jenckel et al., 2015; ICTV, 2019).

A principal forma de transmissão da dos orbivírus é pela picada de insetos do gênero *Culicoides*, que atuam como vetores biológicos. Assim, a distribuição e os surtos da doença estão intimamente ligados ao crescimento da população dos vetores e por isso ocorrem principalmente nos períodos quentes e úmidos que são mais favorável à proliferação desses insetos (Stallknecht and Howerth, 2004). As mudanças climáticas colaboram para o aumento na capacidade vetorial das populações de insetos em áreas anteriormente livres do vírus (Zuliani et al., 2015). Como exemplo, em 2012, no estado de Michigan (EUA), houve surtos severos de DHE, devido à expansão de alcance dos vetores em rebanhos suscetíveis de áreas antes não endêmicas, que resultou na morte de mais de 14.000 veados-de-cauda-branca (Stevens et al. 2015).

As diferentes espécies de *Culicoides*, além de possuírem preferência por hospedeiros, podem apresentar variação na susceptibilidade ou na resistência à infecção por diferentes sorotipos, o que pode explicar na distribuição regional dessemelhante dos mesmos em vários países (Gibbs and Greiner, 1994).

#### 2.2.1.2 Orbivírus no Brasil

Em 1980, foi identificado e isolado BTV sorotipo 4 em um rebanho bovino zebu exportado do Brasil para os Estados Unidos da América (EUA), sendo o primeiro relato de animais brasileiros infectados com orbivírus (Grocock and Campbell, 1982). Já em 2001, foi descrito um surto da doença de língua azul (LA) no Paraná acometendo ovinos e caprinos, sendo depois isolado o BTV sorotipo 12 (Clavijo et al., 2002).

Apesar da maior parte do território brasileiro ser endêmica para LA, ainda se sabe pouco sobre os sorotipos de BTV presentes no país, sendo que diversos estudos demonstram que o vírus é amplamente difundido no Brasil, infectando diferentes espécies de ruminantes (Lobato et al., 2015).

Nas regiões sul e sudeste, pelo menos 11 sorotipos de BTV já foram identificados por RT-PCR e isolados acometendo ruminantes domésticos e selvagens. Em 2001, o sorotipo 12 foi identificado a partir do surto em ovinos e caprinos no Paraná (Clavijo et al., 2002). Em 2009, houve ovinos acometidos com LA no Rio Grande do Sul, sendo posteriormente isolado o sorotipo 12 (Antoniassi et al., 2010). Já em 2013, o sorotipo 4 foi isolado de ovinos no Rio de Janeiro (Balara et al., 2014; Matos et al., 2016). Enquanto, em 2014, foi isolado os sorotipos 1, 4 e 17 de um surto de LA em ovinos também no Rio Grande do Sul (Guimarães et al., 2017). Em estudo de Gasparini et al. (2017), também identificaram e isolaram o BTV do sorotipo 4, 8, 10 e 16 do sêmen de touros assintomáticos no sudeste do Brasil (Figura 5). Por fim, em 2015 e 2016, veados bororós vieram ao óbito com doença hemorrágica no estado do Paraná e foi identificado e isolado os sorotipos 3, 14, 18, 19 e 22 (Baldini et al., 2018). Em estudo realizado por Matos et al. (2016), BTV sorotipo 17 foi isolado de ovinos brasileiros, do Rio Grande do Sul, com sinais clínicos característicos da doença e foi realizado o sequenciamento completo do genoma.

No começo da década de 90 ocorreram os primeiros relatos de cervídeos com sinais clínicos e lesões muito sugestivas de doenças hemorrágicas na região do sul do país, porém não foi realizado o diagnóstico e o agente etiológico envolvido não foi identificado (Arita et al., 1997; Duarte et al., 2012).

Em 1999, foi realizado um levantamento sorológico com ELISA competitivo em 22 cervídeos de cativeiro da espécie *Blastocerus dichotomus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Foi revelado que 74% dos animais eram soropositivos para EHDV, 88% soropositivos para BTV e 60% imunoreagentes para ambos os vírus (Pandolfi, 1999). Em outros estudos, foi realizada a sorologia de 107 cervos-do-Pantanal de vida livre em São Paulo e obteve-se prevalência elevada de 71% de animais positivos para EHDV (Montassier et al., 2001).

Em 2008, um cervídeo da espécie *Mazama nana* veio ao óbito com sinais clínicos sugestivos de doença hemorrágica viral no zoológico Pomerode no estado de Santa Catarina. As amostras de coração, pulmão, intestino e fígado do animal foram encaminhadas para o LPVA-UFMG para os devidos diagnósticos. Assim, foi identificado

o EHDV por PCR e isolado o vírus em células de mamífero e ovos embrionados, e em seguida, realizado o sequenciamento, em que foi identificado o sorotipo 2. Essa foi a primeira descrição de EHDV isolado no Brasil e demonstrou também a susceptibilidade de cervídeos da espécie *Mazama nana* ao vírus (Favero et al., 2013).

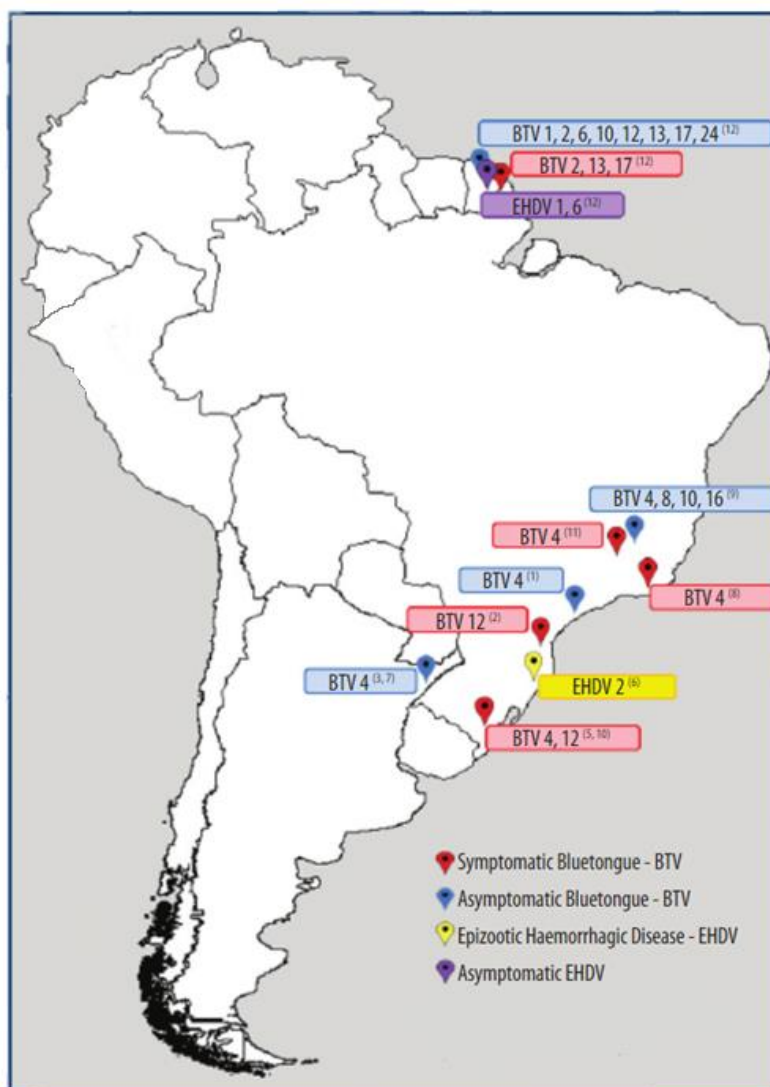


Figura 5: Isolamento e identificação de Orbivirus em ruminantes domésticos e silvestres na América do Sul.

Fonte: Lobato et al. (2015). <sup>1</sup> Grocock and Campbell, 1982, <sup>2</sup> Clavijo et al., 2002, <sup>3</sup> Gorsch et al., 2002, <sup>5</sup> Antoniassi et al., 2010, <sup>6</sup> Favero et al., 2013, <sup>7</sup> Legisa et al., 2013, <sup>8</sup> Balaro et al., 2014, <sup>9</sup> Gasparini et al., 2017, <sup>10</sup> Guimarães et al. 2017, <sup>11</sup> Matos et al. 2016, <sup>12</sup> Viarouge et al. 2014.

Foi realizado um estudo retrospectivo de cervos das espécies *B. dichotomus* e *Mazama gouazoubira*, de 1995 a 2015, a partir de um banco de amostras do Laboratório de Patologia Comparada da Vida de Silvestres (LAPCOM) da Universidade de São Paulo (USP). Dos 207 animais analisados, houve bastantes achados macroscópicos e microscópicos sugestivos de doença hemorrágica viral, no entanto, o diagnóstico molecular não pôde ser realizado (Navas-Suárez et al., 2018).

Em outro estudo retrospectivo, foi selecionado material de arquivo (blocos de parafina) de necropsias realizadas no ano de 1994 a 2011, no Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual de São Paulo (Unesp) tecidos de 42 cervídeos de vida livre e cativo que vieram a óbito com lesões macroscópicas sugestivas de doença hemorrágica. Das amostras analisadas e testados no RT-PCR, todas foram negativas para adenovírus e EHDV, enquanto sete animais foram positivos para o vírus da língua azul seis jovens e uma fêmea adulta, utilizando uma técnica de RT-PCR em tempo real com RNA extraído das amostras parafinizadas (Kawanami, 2012).

Outro trabalho epidemiológico do mesmo grupo de pesquisa foi realizado para pesquisar a doença da língua azul em cervídeos pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) e nos ruminantes domésticos próximos à região. Foram identificados 47,43% dos cervídeos, 90,9% dos bovinos, 55,49% dos ovinos e 19,56% dos caprinos soropositivos no IDGA. Pela técnica de ELISA competitivo foram reagentes ao BTV: 38,46% dos cervídeos, 93,18% dos bovinos, 60,69% dos ovinos e 23,91% dos caprinos. Dos 46 cervídeos que vieram a óbito e dos quais foi realizado o RT-qPCR de seus tecidos, quatro foram positivos para o vírus da língua azul (Kawanami, 2016).

Em 1990, ocorreu o primeiro relato de óbito com hemorragia sistêmica e generalizada da espécie *Mazama nana* no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) da Itaipu Binacional, no Paraná. Desde então, apesar do sucesso na reprodução dos cervídeos em cativeiro, anualmente vários animais vêm a óbito com sintomatologia e lesões compatíveis a doenças hemorrágicas nos períodos de março a junho (Duarte et al., 2012; Baldini et al., 2018).

A Usina Hidroelétrica (UHE) Itaipu Binacional foi construída no ano de 1970, no rio Paraná, ao longo da fronteira entre o Brasil e o Paraguai, sendo pertencente a ambos os países. O processo de construção e desenvolvimento da usina alterou bastante o meio ambiente além das margens da represa. Assim, a Itaipu Binacional tem desenvolvido, ao longo dos anos, projetos para recuperar áreas degradadas, de educação ambiental, de preservação da fauna e flora por iniciativas da usina para promover a sustentabilidade em sua área de influência (Giovanin et al., 2016).

Itaipu Binacional apresenta oito reservas e refúgios biológicos em uma área protegida de 41.039 hectares, composta de mata nativa e trechos de reflorestamento. Esses locais têm o objetivo de auxiliar nas ações fiscalizadoras de proteção ambiental, e garantir a proteção e conservação de espécies animais e vegetais ameaçadas (ITAIPU, 2010; Giovanin et al., 2016). O refúgio de Bela Vista está instalado em uma área de 1.920 hectares na margem brasileira da usina, em Foz do Iguaçu (PR) (ITAIPU, 2010). O refúgio abriga o zoológico Ribas Lage, CASIB e um hospital veterinário que oferece atendimento ambulatorial e clínico aos animais (Giovanin et al., 2016).

O CASIB tem a capacidade de abrigar até 300 animais, sendo que já reproduziu aproximadamente 800 animais de 42 espécies, tendo uma taxa de sobrevivência dos filhotes de 70% (Giovanin et al., 2016). Este recinto tem focado na pesquisa, na conservação e reprodução de espécies ameaçadas de extinção. Assim, têm sido implementados a criação e reprodução de cervos *Mazama nana*, além de outras espécies de cervídeos, com intuito de conservação e preservação destes animais (Duarte et al., 2012). Contudo, após dois anos do início do programa, os cervídeos vêm ao óbito com doença hemorrágica. O veado-mão-curta não é a única espécie afetada no recinto, sendo que outras como *Mazama gouazoubira* e *Blastocerus dichotomus*, também são acometidos e apresentam uma taxa de mortalidade de 100% quando infectados e apresentando o curso clínico. Os laudos de necropsia e de histopatologia de tecidos destes cervídeos têm sugerido a ocorrência de doenças virais. Assim, apesar do diagnóstico presuntivo, a identificação do agente etiológico envolvido permanecia indeterminado (Duarte et al., 2012).

Em 2014 foi observada no CASIB uma soroprevalência de 3,12% para o BTV na população de *Mazama nana*. No ano de 2015 e 2016, quatro animais vieram ao óbito no criadouro apresentando sinais de doença hemorrágica, e as amostras foram enviadas para o LPVA-UFG. Foi identificado a infecção por orbivírus em todas as amostras através do RT-qPCR, e em seguida, realizado o sequenciamento do Seg-2 da proteína viral VP2 para determinar os diferentes sorotipos de BTV (BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22) (Baldini et al., 2018). Em 2017, nove animais vieram também ao óbito por hemorragia generalizada, sendo sete identificados por RT-qPCR positivos para orbivírus, sendo um infectado com BTV-24, um com EHDV-2 e cinco cervídeos com EHDV-1, sendo um deles co-infectado com BTV-12 (Matos et al., 2018).

### 2.3 Doença hemorrágica epizootica

A DHE é um arbovirose, aguda, altamente infecciosa, contudo, não contagiosa, que acomete ruminantes silvestres, principalmente os cervídeos e raramente os animais domésticos (Maclachlan et al., 2015). O primeiro relato descrito foi em 1955, num surto em New Jersey (Estados Unidos - EUA) em cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), onde foi realizado o isolamento do EHDV de um destes animais (Shope et al., 1960).

Atualmente, o EHDV é classificado em sete sorotipos diferentes (1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8). O sorotipo 3 foi incluído como EHDV-1; o EHDV-9 foi agrupado no sorotipo EHDV-6 (Anthony et al., 2009); e o vírus Ibaraki, que teve seu primeiro relato em bovinos no Japão em 1959, foi considerado como EHDV-2 (Uchinuno et al., 2003).

Em contraste ao BTV, o EHDV apresenta maior morbidade e mortalidade entre ruminantes selvagens do que em ruminantes domésticos. Os dados de EHDV nos cervídeos é limitado, mas dependendo da espécie vão apresentar taxas de morbidade e mortalidade de até 90 a 100% (Stallknecht and Howerth, 2004; CFSPH, 2016; Baldini et al., 2018). Assim, o vírus da DHE possui grande impacto na preservação dos cervídeos, pois pode reduzir drasticamente a população desses animais em uma determinada área (Maclachlan et al., 2015).

### 2.3.1 Patogenia

A doença causada pelo EHDV apresenta um período de incubação do 5 a 10 dias e possui patogenia semelhante ao BTV. Ambos os vírus são transmitidos para os hospedeiros através da picada do vetor *Culicoides* infectado. Os vírus replicam inicialmente no local da picada, na pele, em células endoteliais e células do sistema linforeticular (Darpel et al., 2007). Os macrófagos e células dendríticas carregam os vírus até os linfonodos regionais próximos, onde ocorrerá a replicação primária. Depois, há propagação do vírus associada com eritrócitos e leucócitos para outros órgãos linfoides (baço, linfonodos, timo, medula óssea) (Alfieri et al, 2017). Esses vírus se replicam principalmente nas células endoteliais de diferentes órgãos, uma característica marcante na sua patogenia. A lise dessas células leva à lesão nos capilares, edema, hemorragias e coagulação intravascular disseminada (Figura 6) (Howerth, 2015).

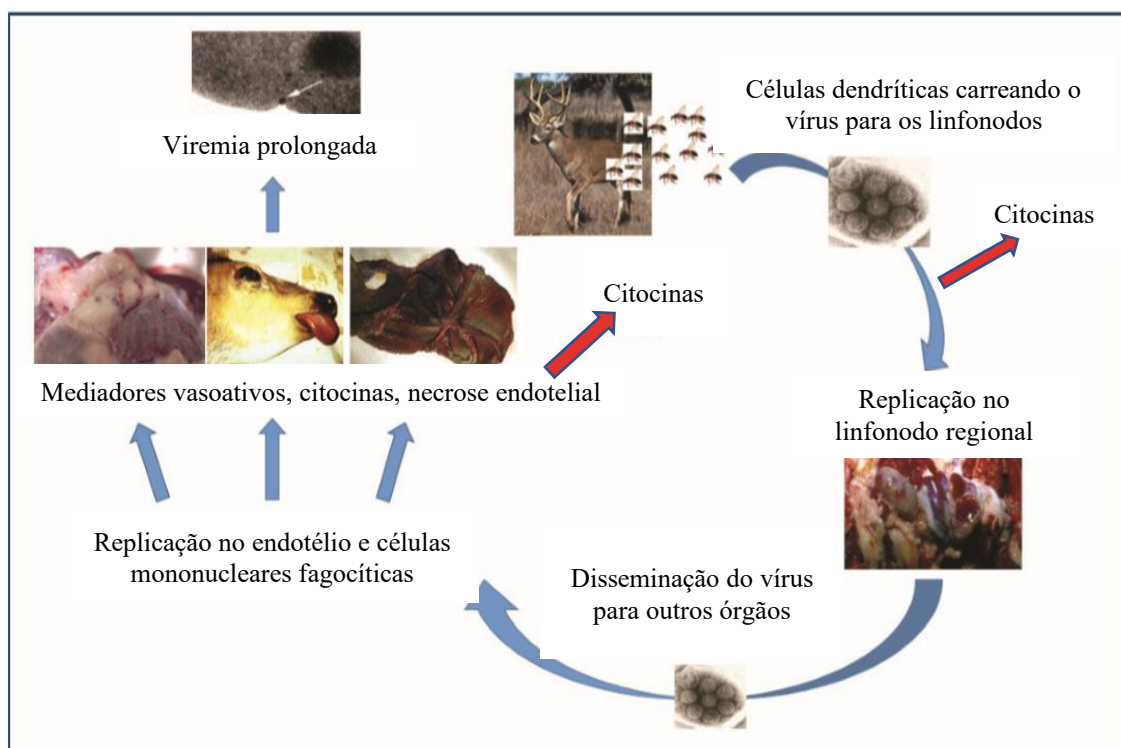


Figura 6: Esquema da patogenia do vírus da doença hemorrágica epizoótica (EHDV) em cervídeos.

Fonte: Adaptação de Howerth, 2015.

O EHDV se liga à glicoforinas na superfície dos eritrócitos, onde permanecem em invaginações da membrana. Assim, o vírus fica protegido dos anticorpos circulantes por longos períodos, resultando em viremia mais prolongada, que proporciona um maior período de transmissão do agente para os vetores (Alfieri et al., 2017). Os cervídeos podem apresentar uma viremia de até 60 dias, enquanto nos bovinos é bem mais longa com até 100 dias, tornando-se importantes na epidemiologia da doença (Howerth, 2015; Alfieri et al., 2017).

Há uma resposta imune inicial com produção de interferon-1, que é importante para determinar o curso da enfermidade. Nos veados-de-cauda-branca, após a infecção com EHDV- 2, o pico da viremia e os níveis de interferon- 1 se correspondem (Quist et al. 1997). Esta resposta é semelhante ao que ocorre com ovinos infectados com BTV (Foster et al. 1991).

A intensa replicação em células mononucleares e endotélio vascular estimula a produção e liberação de outras citocinas inflamatórias, como a interleucina- 1 (IL- 1) e de mediadores vasoativos, como exemplo o óxido nítrico. Assim, vão levar à produção de reagentes de fase aguda, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular ocasionando febre, hiperemia e exsudação de fluido nos tecidos e cavidades adjacentes, levando posteriormente vasculite com lise das células endoteliais (Howerth, 2015).

Após 7 a 14 dias da infecção, os animais desenvolvem resposta imune humoral, com a produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes. No entanto, o vírus ainda pode coexistir com altos títulos de anticorpos por tempo variável, por se ocultarem nas membranas das hemácias (Alfieri et al., 2017).

Os sorotipos apresentam variação antigênica e de virulência entre si que vão influenciar na patogenia e sinais clínicos diferente nos animais afetados. Isso é evidenciado nas infecções naturais e experimentadas de EHDV em bovinos que é subclínica ou assintomática, porém o sorotipo 2 (vírus Ibaraki) e recentemente estirpes descritas de EHDV-2, 6 e 7 causaram doença entre os bovinos de vários países. Os surtos de DHE foram relatados entre bovinos no Mediterrâneo Bacia, Ilha da Reunião, África do Sul e Estados Unidos (Maclachlan et al., 2019).

Os cervídeos desenvolvem doença clínica com todos os sorotipos de EHDV, contudo dependendo da espécie e subespécie, a suscetibilidade ao vírus é maior (Ruder et al., 2015). É o caso das subespécies de cervos de cauda branca do Norte, *O. virginianus borealis*, demonstrou ser altamente suscetível à infecção fatal com sorotipos 1 e 2 quando comparada com uma subespécie do sul, *O. virginianus texanus* (Gaydos et al., 2002a). A espécie *Mazama nana* também foi descrita como muito susceptíveis ao sorotipo 1 e 2 com uma taxa de 100% de mortalidade (Matos et al., 2018).

### 2.3.2 Sinais clínicos

Os cervídeos infectados com EHDV podem apresentar desde sinais clínicos subclínicos até hemorragias sistêmicas e generalizadas, chegando até ao óbito (Fischer et al., 1995).

A DHE pode ser classificada em doença hemorrágica superaguda, aguda ou crônica. A forma superaguda caracteriza-se por febre, anorexia, fraqueza, dispneia, edema acentuado na cabeça, pescoço e língua. Na forma aguda, além dos mesmos sinais clínicos da forma superaguda, observa-se extensivas hemorragias em vários tecidos. Geralmente há salivação excessiva e descarga nasal que pode vir com sangue. Úlceras na língua, gengiva, palato, rúmen e omaso podem ser observadas. Na forma crônica o animal fica acometido por semanas, porém gradualmente se recupera da doença, podendo ser observadas apenas formações anelares nos cascos. As duas primeiras formas descritas possuem altas taxas de mortalidades em cervídeos (Prestwood et al., 1974).

Os casos clínicos observados em cervos de cauda branca variam da forma superaguda, com morte dentro de 36 horas, a um curso mais crônico com os animais que permanecem doentes por diversas semanas. Em muitos casos, ocorre febre, anorexia, letargia, fraqueza, claudicação, dispnéia e edema na cabeça e pescoço. As úlceras e as erosões na cavidade oral geralmente conduzem a salivação e descarga nasal excessiva, que podem ser sanguinolentas. Diarréia e desidratação também já foram observadas e as mortes são comuns durante o estágio agudo da doença (Stallknecht and Howerth, 2004; CFSPH, 2016).

Em bovinos, o curso clínico é comumente assintomático, contudo em infecções com EHDV-2/Ibaraki podem ser observados severos sinais clínicos com febre, lesões erosivas e ulcerativas na cavidade oral e na mucosa esofágica, bem como edema na pele, além da presença de problemas reprodutivos. A mortalidade pode atingir até 10% do rebanho (Uchinuno et al., 2003).

Em cervídeos, o principal diagnóstico diferencial para DHE são outras doenças hemorrágicas virais, que causam sintomas clinicamente indistinguíveis como: LA, doença hemorrágica por adenovírus (DHA) (Cubas et al., 2014; Maclachlan et al., 2015) e febre catarral maligna (FCM), sendo que na última, a formação de trombos é mais difícil (Russell et al., 2009). Outras doenças que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial são as verminoses, intoxicação, febre aftosa e fotossensibilização. Em bovino as principais doenças diferenciais são a LA, FCM, febre aftosa, estomatite vesicular, diarreia viral bovina/doença das mucosas e rinotraqueíte infecciosa bovina (Williamson et al., 2008; OIE, 2009).

### 2.3.3 Lesões macro e microscópicas

Em relação às lesões macroscópicas observadas, nota-se, geralmente, edema, petéquias e hemorragia generalizada e sistêmica, causada por lesão vascular (Fischer et al., 1995).

As lesões em cervos de cauda branca são caracterizadas por lesões hemorrágicas e edema de gravidade e extensão variados. Petéquias, equimoses e hemorragias podem ser encontrados em vários órgãos e tecidos, podendo ser generalizadas. Locais comumente afetados incluem as mucosas orais, pele, casco, tecidos subcutâneos e vísceras, especialmente o coração, aorta, base da artéria pulmonar, trato gastrointestinal, linfonodos, bexiga e cavidades peritoneais. Áreas de erosões e ulcerações são encontradas no trato gastrointestinal, incluindo a boca, o rúmen e o omaso. O edema pulmonar pode ser visto em alguns casos. As lesões necróticas são detectadas no palato duro, na língua, na gengivas, no esôfago, na laringe, no rúmen e no abomasso. Alguns animais podem ter

anéis ou depressões nos cascos (Quist et al. 1997; Cubas et al., 2014; Maclachlan et al., 2015) (Figura 7).

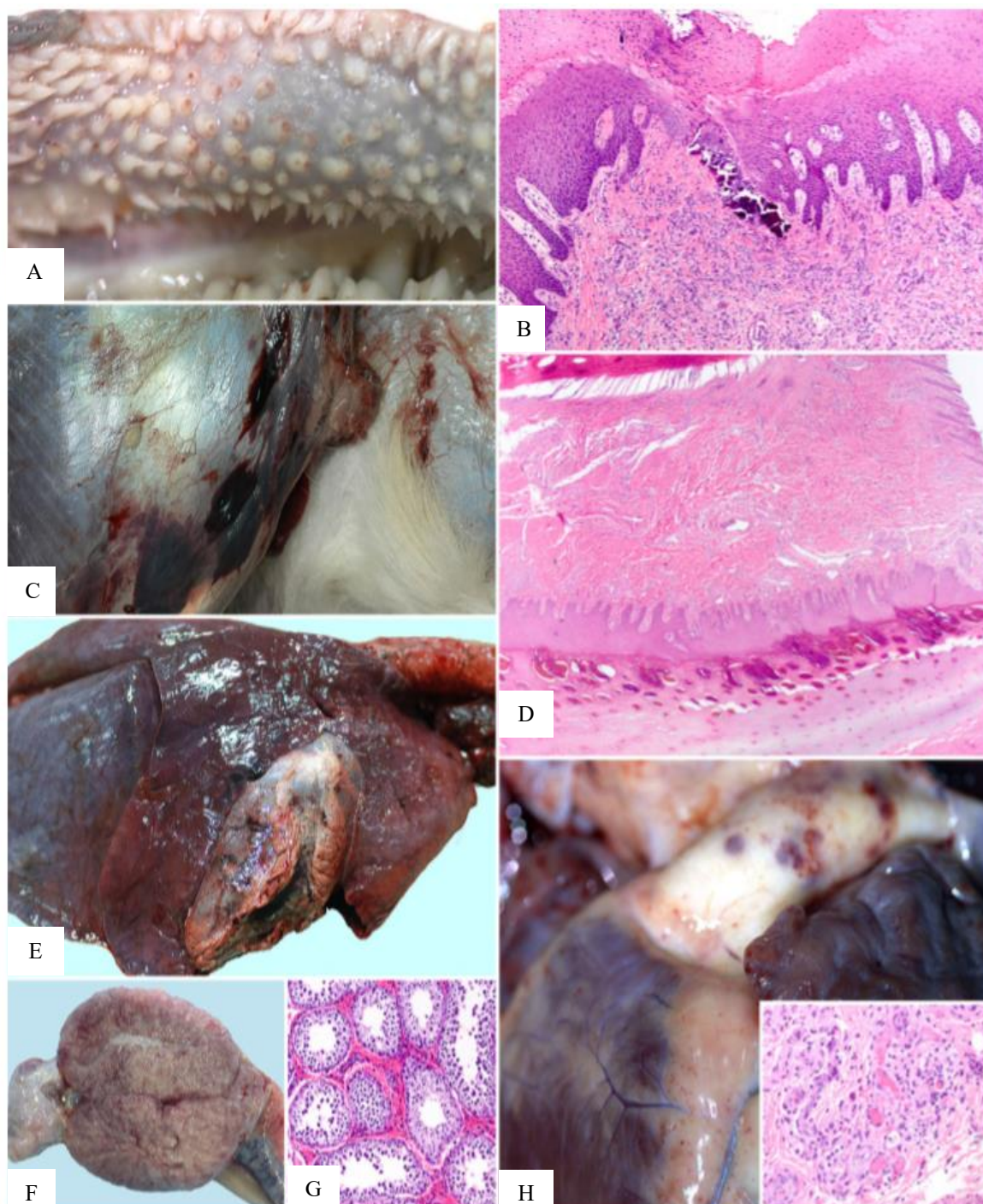


Figura 7: Achados macroscópicos e microscópicos de cervos de cauda branca experimentalmente infectados com o vírus da doença hemorrágica epizootica sorotipo 6 que vieram ao óbito. A: mucosa oral. Papilas orais com hemorragia nas pontas. B: mucosa oral. Mineralização e necrose

focal na derme superficial e necrose epitelial com hemorragia no estrato córneo paraqueratótico subjacente. Há inflamação perivascular leve na derme superficial. H&E. C: parede corporal com pele refletida. Hemorragias equimóticas ao longo da fáscia. D: casco. Hemorragia extensa ao longo da interface entre o cório e a parede interna do casco. H&E. E: pulmão. Congestão difusa e colapso devido a edema pulmonar grave. Há hemorragias no pericárdio. F: testículo. Inchado (edematoso) no testículo e o cordão espermático e o parênquima testicular há hemorragias mal definidas. G: testículo. Hemorragia intersticial generalizada. H&E. H: coração e artéria pulmonar. Hemorragias características na superfície adventícia da base da artéria pulmonar. Inserção corresponde à área de hemorragia adventícia mostra hiperemia contendo trombos de fibrina e inflamação perivascular leve. H&E.

Fonte: Ruder et al., 2015.

Nos veados-bororós (*Mazama nana*) foram observadas cianose e petéquias na mucosa oral, língua e mucosa gastrointestinal, na bexiga e no endocárdio e alças intestinais, e baço e linfonodos hemorrágicos. Já nos pulmões observou-se congestão, petéquias e edema pulmonar (Favero et al. 2013).

As principais lesões histopatológicas, incluem danos endoteliais, vasculites disseminadas, associadas com trombose, hemorragias, degeneração e necrose. Observa-se também infiltrado linfoplasmocitário, congestão e hipertrofia das células endoteliais dos vasos sanguíneos (Cubas et al., 2014; Alfieri et al, 2017) (Figura 7).

Em relatos de DHE em veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) foram observados acúmulo de glóbulos vermelhos no parênquima do baço, nos linfonodos e em uma parcela da região medular dos rins. Há uma intensa hemorragia em todas as camadas dos estômagos e das paredes do intestino. A musculatura do coração, assim como as paredes dos grandes vasos sanguíneos dentro do tórax, apresentam-se hiperêmicas e com extensas hemorragias. No pulmão, observou-se também lesões hemodinâmicas nas paredes e espaços alveolares. Os rins, de alguns animais, apresentaram áreas focais de necrose tubular, possivelmente devido diminuição de fluxo sanguíneo e consequentemente a hipoxia. Foi constatado, na maioria dos tecidos, vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos (Shope et al., 1960; Maclachlan et al., 2015).

Num estudo retrospectivo, estudando cervos neotropicais do Brasil, com as espécies *Blastocerus dichotomus* e *Mazama gouazoubira*, identificou-se lesões sugestivas de orbivírus. Neste trabalho verificou-se achados relativamente comuns de hemorragia sistêmica, envolvendo predominantemente os pulmões, os rins e o fígado, e menos

frequentemente os intestinos, a bexiga e as gonadas. Nas lesões histopatológicas foram identificados dano endotelial generalizado, edema, trombose e hemorragia. Na língua havia hemorragia aguda focal na camada muscular e na submucosa glossal, necrose vascular fibrinóide focal, poucos linfócitos e fibras de colagénio perivascular (Navas-Suárez et al., 2018). Contudo, à semelhança de sinais clínicos e achados macroscópicos de BTV e EHDV, não foi possível chegar um diagnóstico final devido à falta de testes laboratoriais que confirmam o agente etiológico.

Fox et al. (2015) verificaram nos testículos de animais infectados com EHDV, orquite, vasculite, edema e degeneração tubular, fibrose e mineralização, entretanto não foram observadas lesões hemorrágicas. Enquanto estudos de Ruder et al. (2015), observaram hemorragia no interstício dos testículos com 12 dias de infecção em cervídeos experimentalmente infectados com EHDV.

#### 2.3.4 Diagnóstico

As doenças hemorrágicas virais que acometem os cervídeos, destacando LA e DHE, podem causar prejuízos de forma direta ou indireta ao comércio dos animais domésticos, além de ameaçar a sanidade da fauna silvestre, demonstrando assim a importância da realização adequada do diagnóstico. Os sinais clínicos e as lesões macro e microscópicas observadas nas enfermidades supracitadas são indistinguíveis, sendo o diagnóstico laboratorial essencial para identificação do agente etiológico envolvido, além de ser uma ferramenta necessária para a vigilância epidemiológica. O Código Sanitário para os Animais Terrestres da OIE aborda aspectos importantes quanto ao diagnóstico destas enfermidades, além de especificar normas e medidas que devem ser seguidas pelos países membros da OIE para a realização de notificações em casos de ocorrência e estudos de prevalência tanto de LA quanto de DHE (Wilson et al., 2015; OIE, 2016).

Os métodos de diagnóstico geralmente realizados para DHE e LA incluem: isolamento viral, sorologia e detecção do material genético do agente (OIE, 2017). O primeiro era realizado em passagem primária por inoculação intravenosa de ovos de galinha embrionados (ECE) (Gard et al., 1988). Atualmente realiza-se com frequência o

isolamento em cultivo de células de insetos e de mamíferos. As BHK-21 (células de rim de hamster recém-nascido) e as células VERO (células de rim de macaco verde africano) são bastante usadas para detecção de efeito citopático visível (ECP) desencadeadas pelos orbivírus. As células de mosquito, *Aedes albopictus* clone C6/36 e de *Culicoides sonorensis* (KC), não apresentam ECP, mas quando infectados pelos orbivírus, permitem uma intensa replicação viral, por serem bastante adaptadas ao agente. O isolamento viral, mesmo sendo excelente para a detecção do agente (teste padrão ouro), é um método laborioso e demorado (Maclachlan, 2015; Wilson et al., 2015; OIE, 2016).

Os testes sorológicos são extensivamente utilizados para avaliação da prevalência e incidência dos orbivírus, sendo os mais utilizados: a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), a soroneutralização (SN) e o ELISA (Afshar, 1994). Esses métodos baseiam-se na identificação de anticorpos específicos contra os vírus, contudo a sorologia desmonstra apenas que o animal foi exposto ao patógeno e não necessariamente indica a presença do agente infeccioso no organismo do animal (Wilson et al., 2015). O IDGA é muito utilizado na investigação epidemiológica das doenças LA e DHE, contudo é um teste pouco específico e pode haver algum nível de reação cruzada entre estes vírus. A SN detecta anticorpos sorotipo-específicos para BTV e EHDV, contudo por ter custo alto e ser laborioso, é mais usado na mensuração da resposta imune à vacinação, quando já se conhece o sorotipo viral à ser utilizado no teste (Afshar, 1994; OIE, 2016).

As técnicas moleculares são utilizadas para identificação do material genético do agente e podem ser realizadas pela transcrição reversa, seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional ou em tempo real (RT-qPCR) (Toussaint et al., 2007; Clavijo et al., 2010; Schroeder et al., 2013; Maan et al., 2016). Por ser um teste rápido, bastante sensível e por ser possível a utilização de amostras frescas, congeladas ou até mesmo fixadas para identificação do RNA viral, a técnica de RT-PCR vem sendo cada vez mais usada no diagnóstico de BTV e EHDV em diversos laboratórios, e vários ensaios já foram desenvolvidos, incluindo PCR multiplex em tempo real para distinguir BTV de EHDV (Wilson et al., 2009). Entretanto, há necessidade de um corpo técnico qualificado para executar os testes, que têm alto custo e o material genético para ser identificado deve ter boa qualidade (Wilson et al., 2015). Além disso, um aspecto bastante negligenciado

na técnica de PCR é a seleção da amostra e método de extração do ácido nucleico, pois durante a extração de RNA de sangue com EDTA, a qual é uma amostra muito comum no diagnóstico de BTV, tem que ter cuidado com a imunoglobulinas, que podem neutralizar o vírus e interferir no isolamento viral (Wilson et al., 2015).

O sangue é a amostra de eleição para diagnóstico, contudo, outros materiais como sêmen e tecidos podem ser usados para isolamento do vírus e para extração do material genético (Clavijo et al., 2002). Para identificação do EHDV e BTV por PCR, são utilizados primers específicos para o gene do segmento 9 e 10, respectivamente, que codificam proteínas bastantes conservadas dos vírus (Orru et al., 2006; Maan et al., 2016). O gene do segmento 10 apresenta alta semelhança das sequências de nucleotídeos da proteína NS3/NS3A entre sorotipos de BTV, sendo então muito utilizado para o diagnóstico (Orru et al., 2006). No EHDV a detecção dos genes das proteínas não estruturais são bastante utilizadas no PCR (Clavijo et al., 2002). Contudo no estudo de Maan et al. (2016), também demonstraram a eficiência no uso de primers específicos para a helicase viral VP6 (codificada por Seg-9) que é também bastante conservada entre o sorogrupo/espécie do vírus. Enquanto, para determinação do sorotipo dos vírus, é geralmente realizado o sequenciamento das amostras do segmento 2 que codifica a proteína viral VP2, que é a principal imunodeterminante do sorotipo dos EHDV e BTV (Hassan and Roy, 2009; Sailleau et al., 2012).

#### 2.3.4.1 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ), é o conjunto de metodologias que usam anticorpos marcados como reagentes que vão estabelecer ligação com antígenos presentes nos tecidos e possibilita a visualização da presença do antígeno desejado nas células e nos tecidos por meio da cor que se forma pelos complexos antígeno-anticorpo (Ferro, 2013). A imuno-histoquímica desempenha um papel importante em várias áreas da patologia, incluindo patologia oncológica, hematopatologia e no diagnóstico de doenças infecciosas e degenerativas (Orakpoghenor et al., 2018).

A técnica de IHQ, ao contrário das técnicas previamente descritas, garante uma avaliação detalhada das estruturas afetadas, associada à distribuição tecidual dos antígenos. É um método de diagnóstico que correlaciona a lesão histológica com o agente infeccioso, pois há circunstâncias em que a presença do agente pode ser apenas incidental e não estar relacionada com a doença clínica (Wilson et al., 2015).

A IHQ foi iniciada com o método direto, sendo posteriormente melhorada com outras técnicas indiretas que aperfeiçoaram ainda mais sua sensibilidade. O método direto envolve somente uma etapa com anticorpo marcado e o antígeno nas secções de tecido (Figura 8-A). Embora este método seja simples e rápido, tem uma sensibilidade muito menor do que os outros métodos indiretos que são frequentemente utilizados (Ferro, 2013; Orakpoghenor et al., 2018).

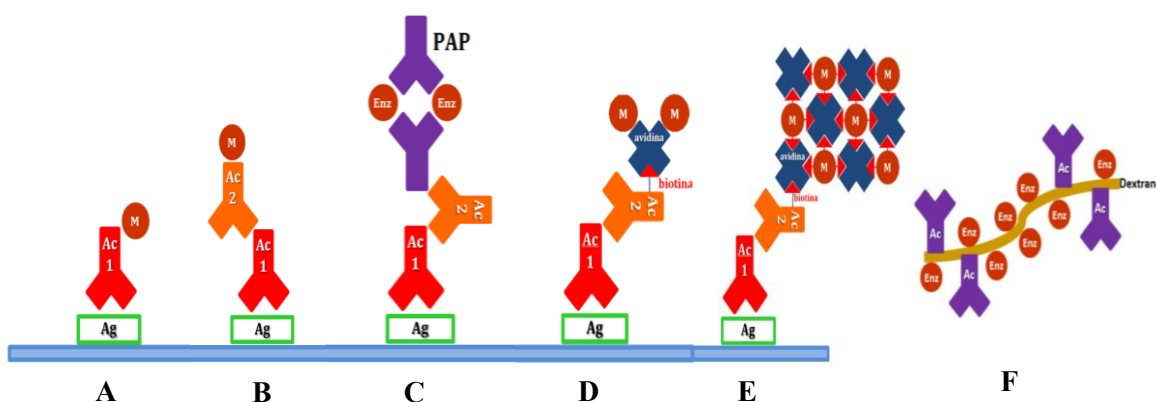


Figura 8: Principais técnicas de imuno-histoquímica. A: Método direto. B: Método indireto. C: Método Peroxidase Anti Peroxidase (PAP). D: Método da avidina-biotina. E: Método do complexo streptavidina-biotina. F: Método por polímero marcado. Ag: Antígeno; Ac 1: Anticorpo primário; Ac 2: Anticorpo secundário; M: Marcador; Enz: Enzima; Triângulo vermelho: biotina; “X” azul: avidina.

Fonte: Adaptação de Ferro, 2013.

Já nos métodos indiretos, a técnica simples envolve o uso de um anticorpo primário não marcado que se liga ao antígeno alvo, sendo seguido pela reação de um anticorpo secundário marcado (Figura 8-B). Assim, o anticorpo secundário reconhece a IgG da espécie animal na qual o anticorpo primário foi produzido. A ligação de vários anticorpos secundários a cada anticorpo primário torna o método indireto mais sensível que o direto (Orakpoghenor et al., 2018).

Dentre os outros métodos indiretos, o da peroxidase anti-peroxidase (PAP) utiliza três tipos de reagentes. Assim, o anticorpo secundário faz uma ponte ligando-se com uma porção Fab no anticorpo primário e outra porção livre no complexo PAP. Este método é bem mais sensível que os outros descritos e permite uma diluição maior do anticorpo primário o que leva a uma diminuição da marcação inespecífica (Figura 8-C) (Ferro, 2013).

O método da avidina-biotina consiste na conjugação do anticorpo secundário com a biotina que é uma proteína existente em grande quantidade na gema de ovo. A biotina apresenta uma ligação química não covalente extremamente forte e rápida com avidina, que consiste em uma glicoproteína com uma estrutura capaz de se ligar a quatro biotinas. Esta avidina geralmente está marcada com uma variedade de substâncias podendo ser uma enzima ou fluorocromo. Esta técnica possui uma alta sensibilidade, já que um anticorpo pode ter ligado 150 moléculas de biotina, e uma grande versatilidade com outros métodos de diagnóstico além da IHQ, como hibridização *in situ* ou citoquímica (Figura 8-D) (Ferro, 2013).

O método da streptavidina-biotina marcada (LSAB) é mais rápido e até oito vezes mais sensível que a técnica da avidina-biotina. A streptavidina é uma proteína obtida da cultura de *Streptomyces avidinii*, que possui afinidade também com a biotina marcada, sendo que diferentemente da avidina, não possui ligação com membranas celulares, diminuindo assim reações inespecíficas (Figura 8-E) (Ferro, 2013).

Contudo, o método de IHQ mais sensível utiliza um polímero marcado que é formado por um esqueleto interno. Assim, consiste em uma macromolécula formada por um esqueleto central, principalmente de dextranos, de grandes dimensões, aos quais estão acopladas grandes quantidades de anticorpos e enzimas. Os dextranos são polissacarídeos hidrofílicos formados a partir da sacarose durante o crescimento de bactérias da família *Lactobacillacea* (Figura 6-F) (Ferro, 2013).

Diversos métodos de execução da IHQ foram estudados para indicar a presença de antígenos de BTV e EHDV em secções de tecidos congelados ou embebidos em parafina, sendo as células endoteliais dos vasos, macrófagos e linfócitos as principais

imunomarcadas (Cherrington et al., 1985; Sánchez-Cordón et al., 2010; Scott et al., 1998; Sharma et al., 2016).

Em um estudo para padronizar IHQ em tecidos parafinizados de caprinos e ovinos, foram utilizados anticorpos contra a proteína viral estrutural VP7 de BTV. Foram observadas, marcações nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, linfócitos e macrófagos em diversos órgãos, sendo imunomarcados principalmente o pulmão, baço e linfonodo(Sánchez-Cordón et al., 2010).

Em outro estudo, em que fizeram a infecção experimental em ovelhas com BTV sorotipo 2, observaram também marcações em linfócitos e macrófagos. Após 7 dias de inoculação, foram identificadas células imunomarcadas, principalmente na zona marginal e polpa vermelha do baço. Após 11 dias de inoculação, começaram a ser visualizadas marcações nos macrófagos e linfócitos dentro dos folículos linfoides e na zona marginal. Assim, foi evidenciado que na infecção aguda de BTV, o vírus é capturado pelos macrófagos e depois reagem com os linfócitos B na zona marginal do baço (Lee et al., 2011). Na infecção experimental de bovinos por BTV sorotipo 10 também houve abundante imunomarcção em linfócitos e macrófagos no baço, nos linfonodos e no timo (MacLachlan et al., 1990).

Kamomae et al. (2018) utilizando a IHQ fizeram o diagnóstico do EHDV-6 em bovinos de corte que apresentavam febre, anorexia, salivação excessiva, dificuldade respiratória e que vieram a óbito. Esses animais apresentaram marcação principalmente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos.

A técnica de imuno-histoquímica já foi padronizada para estudar a dinâmica da infecção do vírus da doença hemorrágica epizootica dentro do vetor *Culicoides sonorensis* sendo analisado o tropismo do vírus na glândula salivar, epitélio do intestino médio e corpo gorduroso (Mills et al., 2017).

#### 2.3.4.2 Imunofluorescência

Outro método de diagnóstico laboratorial utilizado é a imunofluorescência (IFA), que permite a visualização de antígenos nos tecidos e em células utilizando anticorpos

conjugados com corantes fluorescentes, que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda. Assim, a IFA permite uma avaliação detalhada da distribuição viral dentro das células (Wilson et al., 2015). Esta técnica pode ser realizada de duas maneiras: imunofluorescência direta (IFD) e imunofluorescência indireta (IFI). Na IFD, o anticorpo anti-EHDV é marcado com um fluoróforo convencional. Já na IFI, o teste é realizado em duas etapas, na primeira utiliza-se o anticorpo anti-EHDV não marcado, enquanto na outra etapa adiciona-se um anticorpo anti-imunoglobulina conjugado (Santos et al., 2002).

A IFA tem sido bastante utilizada em estudos de patogênese experimental, quantificação de anticorpos e para determinação dos sorogrupos dos vírus de BTV e EHDV (Blacksell & Lunt, 1993; Dadhich, 2004; Wilson et al., 2015), além de ser usada na identificação de *Culicoides* infectados com estes vírus (Jennings et al., 1980; Mecham et al., 2009).

Assim, a imunofluorescência apresenta a vantagem de ser um teste rápido, sensível, de simples execução e que pode ser usada para quantificação de anticorpos. Contudo, a utilização de fluoróforos convencionais conjugados aos anticorpos dificultam a execução da técnica, pois estes apresentam curta duração de emissão da fluorescência (Wilson et al., 2015).

#### 2.3.4.2.1 Quantum dots (qds)

A nanotecnologia e nanociências estão cada vez mais presentes em pesquisas e no cotidiano das pessoas. Assim, com a tecnologia, são cada vez mais frequentes as pesquisas que buscam o desenvolvimento de nanomateriais, na escala de 100 nm, que possam ser utilizados em processos biológicos, para melhorar as novas técnicas de diagnóstico, sendo menos invasivas e mais precisas, assim como o desenvolvimento de novos biomateriais (Toma, 2005; Schatkoski, 2012; Mansur, 2014).

Dentre os nanomateriais, os “Quantum Dots” (QD’s) têm sido bastante estudados para aplicação em diagnósticos de doenças infecciosas. Os QDs são nanocristais de 2 a 10 nm, semicondutores coloidais e inorgânicos. Apresentam uma característica de

confinamento quântico, devido às suas dimensões serem menores ou igual ao raio de Bohr, que consiste no tamanho de  $0,529 \times 10^{-10}$  metros, o que permite alterações nas suas propriedades físicas, químicas, eletrônicas e ópticas. Esse efeito de confinamento consiste na diminuição dos níveis de energia de determinado composto a valores bem discretos resultantes da redução do tamanho de cristais para poucos nanômetros (Mansur, 2010). Em relação às propriedades ópticas do material e o tamanho das partículas, há possibilidade de caracterização das nanopartículas por técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (Peng, et al, 2003) e fotoluminescência (PL) (Lee, et al, 1998).

Os primeiros trabalhos que pesquisam e procuram entender as características dos QDs como marcadores biológicos foram publicados por Bruchez et al. (1998) e Chan & Nie (1998). A partir destes estudos, diversas pesquisas têm surgido os QDs como biomarcadores (Bera et al., 2010).

Os fluoróforos convencionais são compostos de pequenas moléculas de corantes, muito usados na decodificação do DNA e em diagnóstico de infecções. Contudo, podem ser tóxicos e sofrerem desgaste rápido da sua fluorescência (Marsh et al., 2007). Já os QDs possuem alta estabilidade, resistência à fotodegradação e uma forte intensidade de fluorescência que continua ativa por um tempo 100 vezes maior que os corantes orgânicos (Marsh et al., 2007). Foi observado que o brilho dos QDs pode durar de 48 horas (Borm, 2006) até duas semanas (Donaldson et al, 2007), demonstrando sua alta estabilidade. Donaldson et al. (2007), observou que a fluorescência dos QDs pode ser identificada por até quatro gerações celulares, sendo um tempo suficiente para acompanhar um vírus ou até uma mitose celular ao longo de um processo biológico.

Os QDs possuem um largo espectro de absorção e um espectro de emissão estreito, o que faz com que somente uma fonte laser seja necessária para excitá-los em diferentes cores, o que não ocorre em corantes orgânicos. Além disso, as nanopartículas podem mudar a cor emitida através do controle de seus tamanhos. Assim, os menores emitem azul, verde ou amarela, enquanto os maiores brilham nas cores laranja, vermelha ou cinza (Simberg et al., 2007).

Devido ao grande interesse do setor industrial pelos QDs, tem-se impulsionado mais pesquisas visando diminuir os impactos ambientais e a toxicidade do material. Neste sentido, os QDs foram sintetizados de modo a possuírem uma camada externa de um material inorgânico, que seja diferente do material semicondutor central que está sendo revestido, chamados de *core-shell*. Existem diversas publicações que apresentam sínteses deste sistema com QDs tóxicos (Ag, Cd, Pb ou Se) revestidos de materiais não nocivos. Foi observado que o material sulfato de zinco (ZnS) como camada externa é menos tóxico que os materiais de telureto de cádmio (CdTe) e seleneto de cádmio (CdSe), para as células marcadas (Mansur, 2010).

Com as vantagens dos QDs para serem utilizados como nanomarcadores, estes têm sido bastante utilizados para terapias, além do seu potencial de revestimento com os anticorpos, colágeno e outras micromoléculas tornando-os biocompatíveis para uso em diagnóstico (Szent-Gyorgyi, et al., 2008). Estudos já demonstraram a eficiência da conjugação dos QDs em anticorpos (Mansur, 2014), sendo uma ferramenta interessante para melhorar a fluorescência e os limites de detecção da IFA no diagnóstico de doenças infecciosas.

#### 2.3.4.3 RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), consiste em uma técnica da biologia molecular que permite a rápida amplificação das sequências de ácidos nucléicos do gene alvo por síntese enzimática (Wilson et al., 2015). A reação de amplificação de RNA envolve, primeiramente, a transcrição reversa em DNA, para depois com o uso de quatro nucleotídeos (dNTP's), sequências iniciadoras (primers) e uma DNA polimerase termoestável, com variações da temperatura, a obtenção de várias cópias de uma sequência específica de ácido nucléico (Camargo e Silva, 2011).

A RT-PCR quantitativo em tempo real (do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*, curto: RTq-PCR) consiste em uma técnica que permite a quantificação do gene alvo durante o processo de amplificação por meio de sondas específicas fluorescentes durante a reação em cadeia da polimerase.

Assim, o equipamento detecta a fluorescência produzida e determina a quantidade de material genético na amostra. A RTq-PCR além de quantificar os genes de interesse, é rápida, mais específica e sensível que o PCR convencional (Wilson et al., 2015).

Existe diversos teste de RT-qPCR desenvolvidos para identificação do gênero de BTV (Wilson et al., 2004; Orru et al., 2006; Toussaint et al., 2007; Wilson et al., 2009; Maan et al., 2014) e há menos ensaios padronizados para EHDV (Wilson et al., 2009; Clavijo, et al., 2012; Maan et al., 2016). O PCR em tempo real é uma tecnica bastante sensível e útil para identificação dos orbírus em amostras antes do isolamento viral, sendo este último o método preferido e padrão ouro (Wilson et al., 2015).

Para identificação do gênero de EHDV e BTV por PCR, é necessário a utilização de primers específicos para os genes que codificam proteínas conservadas dos vírus, principaimelnte as não estruturais que são produzidas na replicação viral (Orru et al., 2006; Maan et al., 2016). Estas proteínas, NS1, NS2, NS3/NS3a e NS4, são codificadas por Seg-5, Seg-8, Seg-10 e Seg-9, respectivamente (Ratinier et al., 2011). Embora os segmentos do genoma que codificam as proteínas NS1 e NS2 (codificadas por Seg-5 e Seg-8 respectivamente) demonstrem variações que indicam a origem geográfica do isolado do vírus (topotipo), as mesmas não mostram correlação significativa com o sorotipo do vírus (Maan, et al., 2008; Ratinier et al., 2011).

A maioria das técnicas de RT-qPCR utiliza os primers para o Seg-9 e Seg-10, sendo que o gene do segmento 10 do BTV apresenta muita semelhança entre os nucleotídeos de diferentes sorotipos, constituindo-se o principal na utilização do diagnóstico molecular (Orru et al., 2006). No EHDV também segue a mesma metodologia que o BTV, contudo há trabalhos que também utilizam primers específicos para a helicase viral VP6 (codificada por Seg-9) que é também bastante conservada entre o sorogrupo/espécie do vírus (Clavijo et al., 2002; Maan et al., 2016).

Além da utilização para detecção do agente que é importante na investigação de surto ou programa sanitário, o PCR tem sido enpregado na identificação do sorotipo viral que é necessário para estabelecer uma relação soroepidemiológica da região. Já existem testes moleculares de RT-PCR padrão para identificação do sorotipo específico em BTV e EHDV (Wilson et al., 2015). A sorotipagem é muito associada a cominação do PCR

com o sequenciamento, permitindo avaliações epidemiológicas moleculares. do sorotipo do vírus é determinante pelo sequenciamento das proteínas estruturais, principalmente a VP2, codificada pelo segmento 2, em que a principal imunodeterminante do sorotipo dos EHDV e BTV (Hassan and Roy, 2009; Sailleau et al., 2012).

A técnica de PCR tem garantido, cada vez, rápido desenvolvimento na área da genética molecular e permitindo avanços no diagnóstico de doenças e análises clínicas. Na anatomia patológica, mesmo que a avaliação de lesões macro e microscópicas e análises morfológicas sejam o principal foco, os resultados da PCR nos tecidos afetados tem cada vez mais integrado e melhorando estes diagnósticos (Camargo e Silva, 2011).

A análise do PCR dos tecidos é bastante usada para detectar a presença dos agentes infecciosos, pois proporciona uma melhor sensibilidade comparada com outras técnicas, como IHQ e hibridização *in situ*. Contudo, o ideal é que as amostras sejam frescas ou congeladas para obter-se o RNA ou DNA íntegro. Dessa forma, há uma limitação na utilização do PCR em estudos retrospectivos (Jackson et al., 1990).

Na última década, tecidos fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE) têm sido cada vez mais utilizados para identificação de material genético de patógenos para os quais o diagnóstico definitivo não havia sido realizado previamente, sendo fontes importantes para a execução de estudos retrospectivos. Contudo, a extração de RNA de amostras de FFPE é problemática, pois o material genético é mínimo e degrada-se durante o processo de fixação do tecido pela formalina, além de que o armazenamento prolongado também resulta em deterioração do RNA (Yang et al., 2006). O RNA na formalina é severamente degradado em pequenos fragmentos, com média de 100 – 300 nucleotídeos. Além disso, o formol adiciona grupos metilol ( $-CH_2OH$ ) que podem interferir na transcrição reversa do RNA, reduzindo a eficiência do PCR (McKinney et al., 2009). Assim, são necessários complexos métodos de extração do RNA. Entretanto, já existem pesquisas na extração e na detecção do RNA de BTV em tecidos de ovelhas e bovinos infectados, fixados em formalina e parafinizados (Parsonson e Mccoll, 1995; Kawanami, 2012).

### 2.3.5 Controle e prevenção

Para um efetivo controle e prevenção da transmissão do vírus, devem-se seguir as regras de importação e quarentena dos animais, efetivação do teste diagnóstico preconizado pela OIE e notificação de acordo com as diretrizes nacionais e /ou locais (OIE, 2009; OIE, 2017).

Medidas de controle de DHE podem ser tomadas impedindo a introdução de animais ou vetores infectados ou utilizando quaisquer estratégias profiláticas ou terapêuticas em áreas endêmicas. Contudo, o tratamento e prevenção da doença em cervídeos selvagens é geralmente impossível (MacLachlan et al., 2015).

Não existe vacinas comerciais para ruminantes domésticos para EHDV, contudo há disponível vacinas vivas atenuadas e inativadas da doença de Ibaraki utilizadas em bovinos no Japão (OIE, 2009). Nos EUA, empregam-se vacinas inativadas autógenas em alguns rebanhos de cervídeos em cativeiro, contudo sua eficiência ainda é desconhecida. As vacinas de EHDV geralmente devem ser multivalentes, já que a imunidade humoral é específica para o sorotipo e com a frequência, vários sorotipos podem ocorrer na mesma região (OIE, 2009; CFSPH, 2016). A vacinação, mesmo não impedindo a infecção, garante sinais clínicos mais brandos, perdas a um nível muito baixo e redução da viremia, o que auxilia na diminuição da taxa de transmissão (MacLachlan et al., 2019).

As medidas relacionadas à redução da exposição dos mosquitos *Culicoides* podem ser benéficas durante os surtos, contudo não são eficazes como a única medida de prevenção e controle. Entre elas podemos citar: evitar locais em que os insetos são mais prevalentes, como pastagens baixas e úmidas; abrigar animais do anoitecer ao amanhecer em recintos protegidos; uso de inseticidas ou repelentes de mosquitos (MacLachlan et al., 2015). Por causa da sua diversidade de hospedeiros, dos diferentes sorotipos circulantes e da ampla distribuição dos vetores, a erradicação do DHE é quase impossível, principalmente para animais de vida selvagem (MacLachlan et al., 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Padronizar e testar as técnicas de diagnóstico para doença hemorrágica epizootica em cervídeos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Produzir anticorpos policlonais anti-EHDV para serem utilizados nos testes de imuno-histoquímica e imunofluorescência.
- Padronizar e testar a técnica de imuno-histoquímica em tecidos de cervídeos brasileiros que vieram à óbito com EHDV.
- Padronizar as técnicas de imunofluorescência direta em células para EHDV utilizando anticorpos policlonais conjugados a pontos quânticos.
- Padronizar e testar a técnica de RT-qPCR a partir de material parafinado oriundos de cervídeos brasileiros que vieram a óbito com doença hemorrágica.
- Avaliar as lesões histopatológicas em vários órgãos de cervídeos que vieram a óbito com sinais clínicos e lesões macroscópicas compatíveis com DHE.

## 4 MATERIAL E METODOLOGIA

### 4.1 Local do experimento

Os procedimentos de produção de antígeno, de testes sorológicos e moleculares, assim como também toda técnica de imuno-histoquímica e imunofluorescência foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A produção de soro hiperimune foi realizada em coelhos no Laboratório de Soros e Vacinas da Escola de Veterinária da UFMG. Essa parte do trabalho foi aprovada pela CEUA da UFMG - número do protocolo: 263/2017 (Anexo 1).

Uma parte dos anticorpos purificados foram bioconjugados no laboratório do Professor Herman Sander Mansur do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFMG.

O processamento de fixação, emblocamento e corte dos tecidos dos cervídeos, como também a etapa de recuperação antigênica da imuno-histoquímica foram realizados no Laboratório de Histologia e Imuno-histoquímica do setor da Patologia Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG.

### 4.2 Produção do soro hiperimune

#### 4.2.1 Amostra viral

Foi utilizado o EHDV sorotipo 2 (EHDV-2) isolado no LPVA aparti de cervídeos da espécie *Mazama nana* advindo do zoológico de Pomerode em Santa Catarina que é previamente descrito por Favero et al. (2013) para produção de soro hiperimune. As sequências obtidas do segmento 10 correspondente a proteína viral NS3, foram depositadas no GenBank, sendo o número de acesso GUO14478.

Foi realizada a extração do dsRNA do vírus, para teste e certificação da pureza da amostra viral utilizada. Assim, a partir de 50 mL de suspensão viral produzidos foi centrifugada a 3000 xg (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) por 10 min a 4°C. Do *pellet* formado foi extraído o RNA total usando Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup> Califórnia, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA de fita simples (ssRNA) foi obtido pela precipitação com o cloreto de lítio (4 M) e o sobrenadante recolhido foi utilizado para etapa seguinte (Attoui et. al., 2000). Finalmente, o dsRNA viral foi precipitado por adição de 50 µL de acetato de amônio a 7,5 M e 200 µL de isopropanol, lavado uma vez com etanol 70%, e ressuspendido em água livre de RNase.

A análise do dsRNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (AGE) em tampão TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M, ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) contendo 5 µg/mL de brometo de etídio (Sambrook; Russel, 2001). Foi utilizado um marcador de tamanho molecular de 100 pb DNA ladder (Promega, Madison, EUA). O gel foi visualizado através da exposição à UV e fotodocumentado.

#### 4.2.2 Produção da suspensão viral

Para produção da suspensão viral foi utilizado cultivo de células VERO (*African Green Monkey* - passagem nº 213) em garrafa de vidro de 90 cm<sup>2</sup> com 90% de confluência da monocamada celular. Foram inoculados cinco ml da amostra EHDV-2 no cultivo celular e incubados por uma hora em estufa a 37°C e ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio de cultura foi completado com meio essencial mínimo (MEM) com 2% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 0,5% de anfotericina B. A monocamada foi mantida em estufa a 37°C até que se obtivesse 85-90% de efeito citopático (ECP), sendo então acondicionada a 4°C. No dia seguinte, células restantes aderidas na garrafa foram soltas com um rodo (*cell scraper*). A suspensão viral, denominada p.213, foi armazenada em alíquotas para titulação do vírus e o restante em um tubo tipo Falcon de 50 mL.

Para amplificação, a suspensão viral foi diluída à 1:10 e foram adicionados 10 mL na garrafa de vidro de 110 cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células VERO (passagem

n°214), seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Esta segunda passagem foi denominada de p.214.

Objetivando um maior volume e concentração de partículas virais para a produção do antígeno, foram realizadas inoculações de dez garrafas de vidro de 230 cm<sup>2</sup>, seguindo os mesmos procedimentos descritos. Obteve-se 1200 mL de suspensão viral, denominada p.215, que foram armazenadas em um recipiente estéril e devidamente identificado. Determinou-se, também, o título viral deste sobrenadante.

#### 4.2.3 Purificação do vírus

A preparação do antígeno foi realizada de acordo com a técnica de Mertens et al. (1987). Foi centrifugado o sobrenadante viral a 15000 xg (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em um mL de tampão TNEN (10mM Tris-HCl, pH 7,4, 10mM NaCl e 1,0 mM EDTA) e para ruptura das células e liberação das partículas virais passou-se 20 vezes pelo *douncer* no gelo. Foi realizado um *spin* de 15000 xg (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) antes de adicionar a amostra sobre colchão de sacarose de 40%. Em seguida, o material foi centrifugado a 55.000 xg (rotor AH 629 – ultracentrífuga Sorvall) por 75 minutos à 4°C. O sedimento foi ressuspenso em um mL de Tris (0,2 M Tris base com pH 8,0) e armazenado a 4°C.

#### 4.2.4 Produção do inóculo

Para o preparo do inóculo foram utilizados 100 µL do antígeno EHDV-2 purificado adicionado a 600µL de tampão fosfato-salina (PBS) 1X. O material foi mantido por 20 minutos sob ação da radiação ultravioleta (UV) antes de ser adicionado o adjuvante de Freund completo (ACF) (Difco laboratories, Michigan, EUA) ou Freund incompleto (AIF) (Difco laboratories, Michigan, EUA), em proporções iguais (1:1). O composto foi emulsificado por 30 a 40 vezes através de duas seringas com uma agulha acoplada entre elas. Para testar a emulsificação foi adicionada uma gota do inóculo em água destilada. Os inóculos preparados foram armazenados a 4°C até o momento do uso.

#### 4.2.5 Titulação viral

O título viral de cada uma das passagens (p.213, p.214 e p.215) do material após a utilização do *douncer* e do purificado foram determinados através da inoculação destas amostras em suspensão de células VERO seguindo a metodologia descrita pela OIE, 2016. Foram realizadas diluições decimais sucessivas ( $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ ) em placa de 96 poços utilizando-se oito repetições por coluna. A placa foi mantida na estufa em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até sua leitura (96 horas).

O título viral foi calculado pelo método Reed and Muench (1938) e expresso como dose infectante para cultura de células 50% (TCID<sub>50</sub> – *tissue culture infective dose 50%*).

#### 4.2.6 Inoculação, acompanhamento e coleta de amostras

Foram utilizadas duas coelhas fêmeas da raça Nova Zelândia, com quatro meses de idade, pesando em média dois quilogramas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob observação diária e alimentados com ração, feno e água “*ad libidum*”. Antes do início do experimento estes foram mantidos por oito dias para adaptação ao local e ao manejo empregado.

Os coelhos foram inoculados com doses de 0,5 mL do inóculo EHDV-2 por via subcutânea, sendo que foi administrada uma única aplicação contendo ACF no flanco direito e as outras três doses com AIF no flanco esquerdo. O esquema da inoculação e da coleta de sangue estão descritos na figura 09. O sangue foi coletado da veia marginal da orelha dos coelhos e o título de anticorpos foi analisado pelos testes de soroneutralização e imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

Os animais foram acompanhados todos os dias e sempre foi avaliado, lesões dos inoculos e qualquer sinal clínico ou comportamento diferente de estresse que poderiam apresentar.

Após a obtenção do título de anticorpos desejado, os animais foram sedados e eutanasiados conforme recomendações da CEUA. Foi utilizando cetamina (80 mg/kg) e

xilazina (15mg/kg) pela via intramuscular e após sedação profunda, foi realizado a sangria total, obtendo-se o sangue por meio da punção cardíaca.

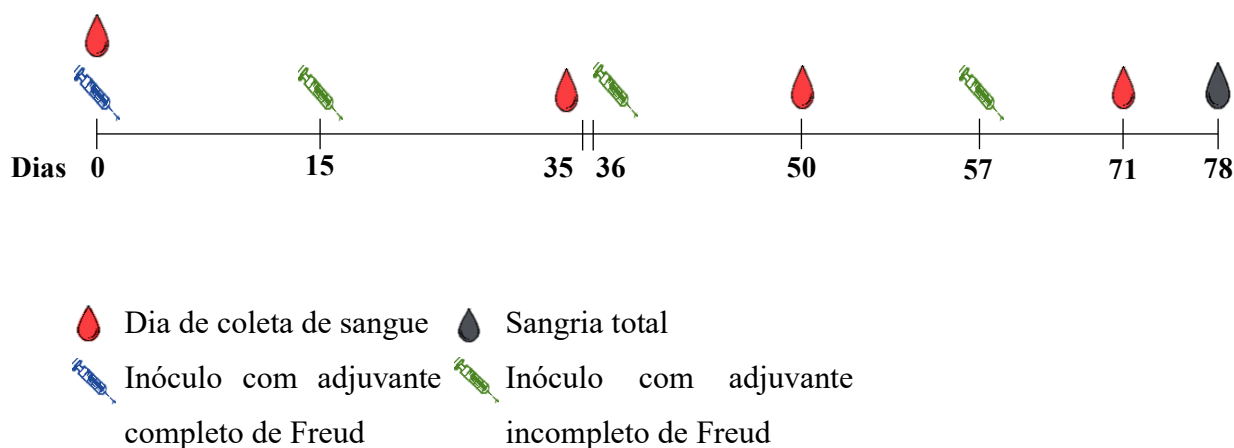


Figura 9: Esquema de coleta de sangue e inoculação dos coelhos para produção do soro hiperimune.

Depois de coagulado, o soro obtido foi mantido a 4°C até ser utilizado para análise pelos testes de soroneutralização e IDGA e posterior purificação dos anticorpos policlonais.

#### 4.2.7 Testes sorológicos

A titulação de anticorpos neutralizantes foi realizada através da técnica de soroneutralização de acordo com a OIE (2016). O teste foi realizado em uma placa de 96 poços utilizando meio MEM com 2% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina 1% e estreptomicina 1%) e antifúngico (anfotericina B 0,5%). Os soros dos animais foram inativados por 30 minutos a 56°C e em seguida diluídos em série na base 2 de 1:10 até 1:1280. Foi adicionada a suspensão viral previamente titulada e diluída contendo 100 TCID<sub>50</sub>/50µL nos soros testes. A placa ficou por uma hora na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo depois mantida a 4°C *overnight*.

No dia seguinte, a placa ficou 30 minutos na estufa em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para regular o pH do meio. Após este período, foi adicionado 50µL de suspensão

de células VERO contendo 50.000 células/cm<sup>2</sup> (contagem através da câmara de Neubauer). A placa foi novamente colocada dentro da estufa e depois de 96 horas foi realizada a leitura. O título de anticorpos foi equivalente a recíproca da diluição que apresentou menos de 50% de ECP na monocamada celular.

Para detecção de anticorpos precipitantes contra o EHDV-2 foi realizado o teste de IDGA segundo Pearson & Jochim (1979). O antígeno e o soro padrão utilizados foram produzidos a partir do isolado de EHDV-2 por Favero et al. (2013). Os soros das coelhas foram testados nas seguintes diluições: puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. As leituras foram realizadas com 48 horas, utilizando-se sistema de iluminação com luz indireta e fundo escuro para visualização de linhas de precipitação antígeno-anticorpo.

#### 4.2.8 Purificação de IgG anti-EHDV-2

A purificação de anticorpos policlonais anti-EHDV-2 foi realizada segundo Mckinney and Parkinson (1987), a partir do soro hiperimune das coelhas. Foram diluídos 10 mL de soro em 40 mL de tampão acetado (60 mM, pH 4,0) e o pH foi ajustado para 4,5 com Tris base 1M. Para purificação das imunoglobulinas foi adicionado lentamente ácido caprílico (25 µL/mL da amostra) sob agitação (600 xg) por 30 minutos a temperatura ambiente e então foi centrifugado a 4.500 g por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado para retenção dos resíduos. A solução foi misturada com PBS 10X (9 partes sobrenadante para 1 parte PBS 10X). Em seguida, foi adicionado lentamente o sulfato de amônio (0,277 g/mL) para saturação de 45% da solução e promover a precipitação da IgG. A solução foi centrifugada a 4.500 g, por 20 min, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspendido em PBS. Então, foi realizado a diálise da solução em PBS por 48 horas a 4°C sob lenta agitação (600 xg). A IgG purificada foi homogeneizada, aliquoteada em volume de 100 µl e armazenada a -20°C.

Os anticorpos purificados foram quantificados pelo método de Bradford (1976) utilizando Comassie Blue G-250 e por soroneutralização (OIE, 2016).

### 4.3 Amostras dos tecidos de cervídeos

A Itaipu Binacional e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) autorizaram o processamento e análise dos tecidos (SISBIO nº 61638) (Anexo 2). O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Protocolo nº 123 / 2018) (Anexo 3).

O Refúgio Biológico de Bela Vista, da Itaipu Binacional, em Foz de Iguaçu, no Paraná, Brasil é dividida em três locais: Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), Zoológico Roberto Ribas Lange (ZOO) e um hospital veterinário, sendo que os cervídeos ficam nos dois primeiros. Todos os cervos são identificados com brincos numerados.

Em 2017, no período de abril a junho, nove cervídeos, sendo sete veados-bororó (*Mazama nana*) e dois veados-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), de ambos os sexos, vieram a óbito por doenças hemorrágicas sistêmicas e generalizadas. Um dia antes do falecimento, foi realizada avaliação clínica dos animais e tratados de forma paliativa sem êxito. Foi efetivado a necropsia e feito a avaliação macroscópica e o diagnóstico morfológico, sendo atestado causa mortis por hemorragia generalizada (Anexo 4). Em seguida, fragmentos de vários órgãos foram coletados: baço, linfonodos, rim, bexiga, fígado, pâncreas, intestino, rúmen, retículo, omaso, encéfalo, testículo, pulmão e coração. Parte das amostras foram previamente acondicionadas a 4°C, enquanto outra parte foi armazenada em formol a 10%, sendo todas devidamente identificadas e encaminhadas para a análise e processamento no LPVA (Tabela 1).

Das amostras de tecido coletados, fragmentos de coração, baço, bexiga, fígado, linfonodo, pulmão e rim, previamente refrigerados, foram submetidos ao diagnóstico molecular e isolamento viral. Ambas são técnicas realizadas por outros pesquisadores do grupo do LPVA, que gentilmente cederam os resultados e as amostras para que fossem utilizadas neste trabalho. Destes órgãos o RNA foi individualmente extraído seguindo o protocolo do Trizol® (Invitrogen™ Califórnia, EUA). Depois, as amostras de RNA extraído foram processadas pela técnica de RT-qPCR para identificação da espécie viral,

BTV ou EHDV, sendo uma técnica já padronizada e utilizada no LPVA. Para identificação do EHDV utilizou-se primers específicos para o gene do segmento 9 seguindo o protocolo de Maan et al. (2016), enquanto para o BTV foram utilizados primers específicos para identificação do segmento 10 de acordo com Orru et al. (2006) (Tabela 2).

Foi realizado o isolamento viral dos fragmentos dos órgãos individuais em células de inseto. Depois de 10 dias de inoculação o sobrenadante foi coletado e o mesmo foi testado usando o mesmo protocolo de RT-qPCR. Em seguida, foi realizado o sequenciamento do Seg-2 da proteína viral VP2 das amostras segundo Sailleau et al. (2012) para determinar os sorotipos de BTV e EHDV (Tabela 1). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank, sendo o número de acesso MF325800 para EHDV-1 e MF325801 para EHDV-2.

O resultado da RT-qPCR e do isolamento viral foram utilizados neste estudo como teste padrão “ouro”.

Tabela 1: Descrição e caracterização das amostras formalizadas de tecidos dos cervídeos que vieram a óbito em 2017, em Foz de Iguaçu-PR.

Identificação do animal na necropsia	Origem do animal	Espécie	Sexo	Idade	Data do óbito	Tecidos coletados	Diagnóstico e sorotipo (RT-qPCR e sequenciamento)	Isolamento viral
NEC 2624	CASIB	<i>B. dichotomus</i>	M	Adulto	08/04/17	Fígado, coração, rim, bexiga, linfonodo, baço, testículo, pâncreas, intestino e rúmen	EHDV-1	+
NEC 2626	CASIB	<i>M. nana</i>	F	Filhote	25/04/17	Fígado, coração, pulmão, rim e bexiga	Negativo	-
NEC 2630	CASIB	<i>M. nana</i>	M	Adulto	27/04/17	Fígado, coração, pulmão, rim e bexiga, baço, linfonodo, testículo, pâncreas, intestino, retículo, omaso e abomasso	EHDV-2	+
NEC 2632	CASIB	<i>M. nana</i>	M	Adulto	08/05/17	Fígado, coração, pulmão, rim, baço, linfonodo, bexiga e testículo	BTV-24	+
NEC 2634	CASIB	<i>M. nana</i>	M	Jovem	15/05/17	Fígado, coração, pulmão, rim, baço, bexiga, testículo, pâncreas, intestino, rúmen, retículo, omaso e abomasso	EHDV-1	+
NEC 2637	ZOO	<i>M. nana</i>	F	Adulto	20/05/17	Fígado, baço, coração, pulmão, rim, encéfalo e bexiga	EHDV-1	+
NEC 2640	CASIB	<i>M. nana</i>	F	Adulto	26/05/17	Coração, pulmão, baço, linfonodo, rim, bexiga, fígado, intestino, rúmen e omaso	EHDV-1	+
NEC 2642	ZOO	<i>B. dichotomus</i>	F	Jovem	09/06/17	Coração, bexiga, rim, baço, fígado, pulmão, rúmen, retículo, omaso, intestino, linfonodo.	Negativo	-
NEC 2644	ZOO	<i>M. nana</i>	F	Adulto	19/06/17	Coração, bexiga, rim, baço, fígado, pulmão, encéfalo, intestino, rúmen, retículo, omaso e abomasso	EHDV-1 e BTV-12	+

F: Fêmea

M: Macho

BTV: *Bluetongue virus*

EHDV: Vírus da doença hemorrágica epizoótica

CASIB: Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional

ZOO: Zoológico Roberto Ribas Lange

-: Negativo/não

+: Positivo/sim

Tabela 2. Primers utilizados no RT-qPCR para identificação do EHDV e BTV e o número de acesso do GenBank das seqüências-alvo.

Gene	Referência	Primer	Sequência	Pb	GenBank
Seg-10 para BTV	Oru et al. (2006)	<i>Forward</i>	5'AYAAAGCGATGTCAA A3'	91	AY438034
		<i>Reverse</i>	5'TCATCACGAAACGCTT C3'		
		<i>Probe</i>	5'FAMCCGGTGCTACGCA AACACAGGDABCYL3'		
Seg-9 para EHDV	Maan et al. (2016)	<i>Forward</i>	5'ATGTCAGCTGCGGTYT TG3'	97	AUS1995/02
		<i>Reverse</i>	5'TCCCAATCAACTAART GRATYTG VATCT 3'		
		<i>Probe</i>	5'CCTCGGTCGAACGTTG GATCAC 3'		

BTV: *Bluetongue virus*

EHDV: Vírus da doença hemorrágica epizootica

Seg: Segmento

Tm: Temperatura de fusão

Pb: Pares de bases

#### 4.4 Processamento das amostras para imuno-histoquímica e histopatologia

As amostras no formol 10% foram armazenadas à temperatura ambiente no LPVA por um período de um a três meses. Fragmentos de cada órgão foram seccionados e colocados em cassetes onde foram processados no equipamento histotécnico Leica ASP 300 (Leica, EUA). Após esta etapa, os tecidos foram emblocados com parafina histológica a 56-58°C. Em seguida, os blocos foram seccionados em 3 µm de espessura utilizando o micrótomo rotatório Leica- Reichert RM 2035 (Leica, EUA). Posteriormente, as amostras foram colocadas num banho-maria a 37°C onde o tecido foi estendido e coletados com lâminas de vidro polarizadas e não polarizadas. Os cortes de tecidos nas lâminas não polarizadas foram processados e corados em hematoxilina e eosina (HE), segundo Luna (1968), para posterior avaliação histopatológica dos tecidos. Os cortes histológicos fixados nas lâminas polarizadas foram utilizados na padronização da técnica de imuno-histoquímica, onde foram avaliadas suas respectivas marcações.

#### 4.5 Padronização da imuno-histoquímica

Para a imunomarcção dos cortes histológicos, foi utilizada a técnica da Streptavidina conjugada com peroxidase baseada na metodologia descrita por Sánchez-Cordón et al. (2010) e Mills et al. (2017), com algumas modificações. Foram utilizadas as amostras de tecidos dos seis cervídeos que foram positivos para EHDV pela técnica de RT-qPCR (Tabela 1).

A avaliação da IHQ foi realizada nos seguintes órgãos coletados: baço, pulmão, testículo, coração, fígado, linfonodo e rim. Os três primeiros tecidos citados do animal NEC 2630, foram usados para padronização da técnica e, depois, como controles positivos na reação de IHQ dos outros órgãos.

Os cortes montados nas lâminas polarizadas foram incubados em estufa a 37°C *overnight*. Em seguida, foram desparafinados em duas imersões em xilol, por 25 minutos cada, e hidratadas com decrescentes concentrações de etanol (três de álcool absoluto, uma de 90%, uma de 80% e uma de 70%) por cinco minutos cada. A cada etapa foram intercaladas com duas lavagens com PBS-T (PBS1X filtrado com Tween 20 a 0,05%), por 5 min cada. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3%, por 30 minutos à temperatura ambiente na câmara úmida, para bloqueio da peroxidase endógena.

Para a recuperação antigênica, foi testada a proteinase K 0,1% por 8 minutos. Além disso, utilizou-se o tampão de citrato (10 mM ácido cítrico, 2 mM EDTA, Tween 20 a 0,05), sendo avaliado nos pH 6 ou 9, aquecido em panela a vapor, micro-ondas ou banho-maria e testado em dois tempos de 30 e 45 minutos, sendo depois resfriado à temperatura ambiente.

Em seguida, as lâminas foram tratadas com a solução de bloqueio testando soro de cavalo 1% em tampão Tris 0,05 M, albumina bovina 6% (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) ou leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé™) a 2% e 2,5% diluído em PBS1X filtrado. A última solução referenciada, foi também examinada nos tempos de incubação de 30 a 45 minutos na câmara úmida na estufa a 37°C.

Na etapa seguinte, os cortes histológicos foram cobertos com anticorpo primário (IgG de coelho anti-EHDV-2) e testado a incubação a 4°C por 18 horas ou 1 hora na câmara úmida na estufa a 37°C. Para determinar a melhor concentração dos anticorpos policlonais foram utilizadas as seguintes diluições: 1:25, 1:30, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:500 e 1:800. Foi selecionada a maior diluição que permitiu a melhor imunomarcação dos antígenos nos tecidos com a menor ou inexpressiva coloração de fundo.

A seguir, os cortes histológicos foram incubados com anticorpos secundários biotilizados durante 45 minutos em câmara úmida a 37°C. Em seguida, foi adicionada solução contendo streptoavidina-peroxidase (kit DAKO™ LSAB®2 System-HRP - Califórnia, EUA) em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

Foi preparada a solução do cromógeno 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma-aldrich®, Missouri, EUA) a partir da diluição de um tablete em 2,5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Em seguida, foi diluído 0,1 mL do AEC/DMF em 1,9 mL de tampão acetato (50 mM, pH 5,0) e depois adicionado peróxido de hidrogênio na proporção de 1:1. Foi adicionado a solução do cromógeno nos cortes histológicos e deixado agir durante 10 a 20 minutos até revelação da marcação, sendo acompanhada pelo microscópico óptico.

Por fim, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por 90 segundos e feita a montagem da lâmina usando lamínulas e o composto Fluoromount-G (Invitrogen™ Califórnia, EUA). As lâminas foram analisadas no microscópico óptico e a intensidade de imunomarcação foi classificada de acordo com os parâmetros de quantidade, intensidade e distribuição descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação em escores da intensidade de marcação de anticorpo anti-EHDV na imuno-histoquímica.

<b>Escores</b>	<b>Intensidade da marcação de anticorpos anti-EHDV</b>
-	Nenhuma marcação
+	Poucas marcações focais
++	Moderadas marcações focais
+++	Marcações multifocais e moderadas
++++	Marcações intensas e difusas

Fonte: SÁNCHEZ-CORDÓN, 2010.

#### 4.5.1 Controles utilizados na imuno-histoquímica

Foram utilizados os seguintes controles: a) Controle do soro primário: foram utilizados as mesmas secções do órgão e animal positivo para EHDV seguindo a mesma metodologia, contudo utilizando o soro das coelhas coletado antes da imunização (dia zero); b) Controle do anticorpo secundário: para testar ligação inespecífica, foi utilizando os mesmos tecidos e métodos, contudo em vez da incubação do anticorpo primário foi utilizado PBS1X nas amostras; c) Controle negativo: foi realizado a mesma metodologia, mas utilizando anticorpo primário anti-EHDV em tecidos de cervídeos negativos no RT-qPCR para testar as marcações inespecíficas provenientes da incubação com o anticorpo primário.

#### 4.6 Imunofluorescência

Os anticorpos policlonais anti-EHDV-2 de coelhos foram testados e padronizados para imunofluorescência direta e indireta em monocamadas celulares infectadas com EHDV sorotipo 2.

##### 4.6.1 Imunofluorescência direta com pontos quânticos (QDs)

Foram utilizados anticorpos de coelhos anti-EHDV bioconjugados com pontos quânticos (QDs), ZAIS (core-shell AgInS<sub>2</sub>-ZnS) e CdS (core-shell CdS-ZnS), ambos estabilizados pelo polissacárido quitosana. A conjugação destes anticorpos foi realizada segundo Mansur et al. (2014).

A reação de imunofluorescência foi realizada em monocamada de células fixadas em lâmina de vidro. Assim, lâminas foram preparadas em uma placa de 24 poços adicionando 50.000 células VERO por cm<sup>2</sup> em suspensão celular e infectando metade delas com EHDV-2 previamente titulado e diluídas para conter 100 TCID<sub>50</sub>/50µL, enquanto a outra parte continha somente células não infectadas. A placa contendo as lâminas ficou por 18 horas na estufa em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Posteriormente, a monocamada foi fixada com paraformaldeído 4% (PFA) por 20 minutos e poros na membrana plasmática das células foram feitos utilizando-se Triton (Sigma-aldrich®, Missouri, EUA) a 0,5%. Após, foi aplicada uma solução de bloqueio (PBS1X, albumina bovina 1% - BSA, triton 0,5% e soro de cavalo a 5%) por uma hora em câmara úmida. Então foi adicionado o anticorpo marcado com QDs puro e, também, como controle, ZAIS e CdS sem estarem conjugados com anticorpo, e foram incubados por duas horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a montagem com Fluoromount-G (Invitrogen™ Califórnia, EUA). As lamínulas foram visualizadas no Eclipse Ti microscópico confocal (Nikon Instruments, EUA) no laboratório de Imunobiofotônica no Instituto Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para identificação das marcações.

Como controle e prova da infecção do vírus EHDV nas células foi ajustado e realizado uma imunofluorescência indireta (IFI) que já é bem usada e descrita no diagnóstico do vírus da LA (Blacksell et al., 1994).

A IFI foi realizada utilizando proteína G conjugada com o Alexa Fluor 488 (Invitrogen™ Califórnia, EUA). A reação foi realizada em monocamada de células BHK-21 em uma placa de 96 poços, em que metade dos poços foram infectados com EHDV-2 previamente titulado e diluído para conter 100 TCID<sub>50</sub>/50µL e a outra metade continha somente células. No dia seguinte, foram fixadas com 50% de acetona e 50% de metanol durante 10 minutos e submetidas à reação de imunofluorescência indireta. Foi incubado anticorpo primário policlonal anti-EHDV-2 (1:50, 1:100, 1:150 e 1:200) por 1 hora a 37°C em câmara úmida, e em seguida a placa foi lavada com tampão de enxague (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, água destilada). Depois foi adicionada a proteína G conjugada com o Alexa (1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000) por 60 minutos a 37°C em câmara úmida. Após a placa foi lavada duas vezes com o tampão de enxague. A monocamada celular foi também contra corada com azul de Evans a 0,005% por 15 minutos. Por fim, foi visualizado no microscópio de fluorescência Leica DMIL LED 353689 (Leica, EUA) no aumento de 400X.

## 4.7 Reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-qPCR) em amostras parafinizadas

### 4.7.1 Extração do RNA

O RNA viral foi extraído do baço, coração, fígado, pulmão e rim, fixados no formol e emblocados na parafina. Os tecidos foram oriundos de todos os animais positivos para EHDV e de dois animais negativos, sendo um deles positivo para o vírus da Língua Azul.

As amostras foram cortadas em 16 fatias de 10µm no micrótomo Leica-Reichert RM 2035 (Leica, EUA) e colocadas em dois tubos *RNAse free* distintos com 8 fatias em cada um. Em cada tubo foi usada uma metodologia diferente de extração, sendo que as primeiras etapas de desparafinização dos tecidos foram iguais. Assim, as secções passaram por uma sequência de um mililitro de xilol e centrifugação a 10.000 xg, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o passo anterior foi novamente repetido. As fatias de tecido presentes nos tubos foram lavadas três vezes cada, com um mililitro de etanol a 100% refrigerado a 4°C e depois foram deixados invertidos por 10 minutos para secagem.

Em seguida, foram testados dois protocolos distintos de extração de material parafinado, a partir da etapa anterior após evaporação de todo etanol. No primeiro método, foi colocada uma solução tampão digestão (0,5 mg/mL de proteinase K, 20 mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA e SDS 20%). Então, os tubos contendo o material parafinado foram incubados em banho-maria a 37°C por 4 horas, segundo Stanton et al. (2002). Em seguida, a extração e isolamento do RNA viral foram realizados de acordo com o protocolo de Trizol® (Invitrogen™ Califórnia, EUA) acrescentando 7,5 M de acetado de amônia. Os materiais foram ressuspensos em 30µL de água *RNAse free* e armazenados a 4°C.

No segundo método, as outras oito fatias de tecido seguiram o protocolo de extração segundo as recomendações do kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation da Invitrogen (Invitrogen™ Califórnia, EUA) e armazenados a 4°C.

#### 4.7.2 RT-PCR em tempo real

Imediatamente após a extração do RNA das amostras foi realizado PCR quantitativo em tempo real precedida da transcrição reversa (RT-qPCR) seguindo o protocolo padronizado por Maan et al. (2016) e já padronizada no LPVA. Para amplificação do RNA viral foram utilizados iniciadores específicos para o segmento-9 do genoma viral do EHDV.

Os valores de limiar de ciclo (Ct) das amostras de EHDV dos tecidos parafinizados foram comparados com os dados de Ct obtidos das mesmas amostras refrigeradas e previamente processadas para o diagnóstico e identificação viral, quando tinham chegado no laboratório. Neste caso as amostras frescas tiveram o RNA imediatamente extraído e submetidas à técnica de RT-qPCR também pelo mesmo protocolo de Maan et al. (2016) e com ponto de corte de 35 no Ct.

#### 4.8 Análise dos dados

Os resultados do isolamento viral e do RT-qPCR em tecidos frescos e respectivos valores de Ct foram usados como teste padrão “ouro” para o método de imuno-histoquímica.

As lâminas de histopatologia foram avaliadas em relação às suas respectivas alterações. Os resultados de imuno-histoquímica foram avaliados por um sistema de classificação semi-quantitativo em escala de escores para a intensidade e distribuição da reação específica e comparado com os dados obtidos no RT-qPCR calculando a especificidade e sensibilidade do teste (Tarabla, 2000; Sánchez-Cordón, 2010).

Os dados da extração de material genético de tecidos parafinizados foram comparados com os obtidos no RT-qPCR em tecido fresco em relação aos valores de CT. Assim, foi realizado um teste de correlação para os valores antes e depois da fixação juntamente com a especificidade, sensibilidade, concordância (Tarabla, 2000) e teste kappa no software Epi Info™.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção do soro hiperimune

#### 5.1.1 Caracterização da amostra viral

O dsRNA da amostra foi analisado e verificou-se nenhuma contaminação com outro vírus. O padrão de migração das bandas dos segmentos foi de três agrupadas, depois mais três, em seguida mais três e depois com mais uma banda isolada na corrida na eletroforese (3-3-3-1) que foi compatível com os observados nos orbivírus do gênero BTV e EHDV. As bandas dos Seg-7 e Seg-8 estão bem mais próximas, sendo características do EHDV e contrastam com o BTV, no qual se observasse as bandas em questão um pouco mais separadas (Figura 10). Estes achados corroboram com os observados por Belaganahalli et al., 2013 que obtiveram o mesmo padrão de migração do BTV e EHDV, sendo que ambos apresentam um dsRNA na corrida de eletroforese diferente de outras espécies do mesmo gênero (Maan et al., 2007; Anthony et al., 2009; Belaganahalli et al., 2013). Assim, confirmamos que a amostra viral utilizada não estava contaminada com outro orbivírus que pudesse comprometer a produção do anticorpo.

#### 5.1.2 Produção do antígeno

No processo de obtenção da amostra viral para o inóculo foram realizadas três passagens do vírus, sendo que na terceira obteve-se 1200 mL de suspensão de EHDV-2 e restos celulares. Este material foi concentrado 800 vezes e obteve-se 1,5 mL do antígeno. Os títulos virais das amostras obtidas durante as passagens e no processo de produção do antígeno estão descritos na Tabela 4.

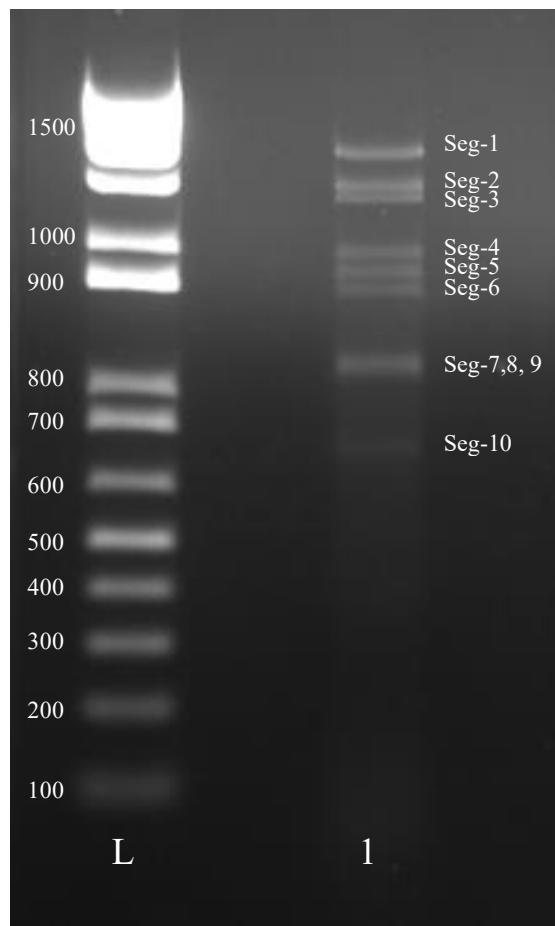


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% para dsRNA do antígeno viral. L: 100 pb DNA ladder (Promega, Madison, EUA). 1: Amostra viral do pool de 1200 mL.

Tabela 4: Titulação do sobrenadante viral nas várias etapas de produção e purificação do antígeno.

Amostra viral/Antígeno	Título TCID <sub>50</sub> /50μL
Nº 213	10 <sup>4,8</sup>
Nº 214	10 <sup>4,7</sup>
Nº 215	10 <sup>4,5</sup>
Após o <i>douncer</i>	10 <sup>6,5</sup>
Antígeno purificado	10 <sup>7,4</sup>

### 5.1.3 Produção do inóculo e soro hiperimune

O inóculo viral tanto com ACF como com AIF foram produzidos no mesmo momento. Todas as emulsificações foram eficazes já que os compostos após o processo

não se dispersaram na água destilada. Aplicou-se 0,5 mL de inóculo por via subcutânea no dorso de cada coelha contendo  $3,312 \times 10^7$  partículas virais/mL.

Após aplicação do inóculo com ACF no lado direito houve o aparecimento de granulomas com severa inflamação, hiperemia e dor local, regredindo no terço final do experimento. Devido a sensibilidade na área de aplicação do ACF, foram aplicadas as outras doses com AIF no dorso esquerdo dos animais. Nessas, observou uma leve reação inflamatória que regredia em uma semana após a aplicação.

Foram coletadas as amostras de sangue das coelhas nos dias 0, 35, 50, 71 e 78 após a vacinação. Os soros foram separados e não apresentaram hemólise.

No IDGA, nenhuma das coelhas apresentou linha de precipitação no dia zero. A partir do dia 35, os dois animais foram imunoreagentes até o dia 78 após a inoculação. A coelha 2 apresentou um aumento do título de anticorpos mais cedo que a coelha 1 (Figura 11; Tabela 5).

Tabela 5: Resultados de Imunodifusão em Gel de Ágar para o Vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica nas coelhas imunizadas para produção de soro hiperimune.

Soro	Dia 0		Dia 35		Dia 50		Dia 71		Dia 78	
	Coe 1	Coe 2	Coe 1	Coe 2	Coe 1	Coe 2	Coe 1	Coe 2	Coe 1	Coe 2
<b>Puro</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>1/2</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>1/4</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Coe: Coelho

½: Diluição ½ do soro

¼: Diluição ¼ do soro

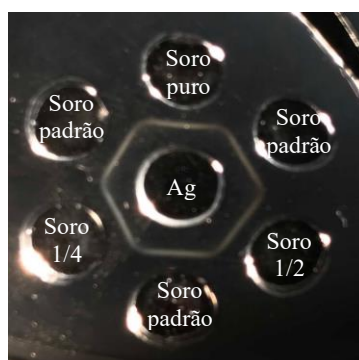


Figura 11: Imunodifusão em Gel de Ágar para o Vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) na coelha 02 no dia 71 após aplicação do inóculo. Ag: Antígeno de EHDV purificado.

Na soroneutralização, as coelhas também não apresentaram anticorpos anti-EHDV-2 no dia zero. Após 35 dias da aplicação do primeiro inóculo, as duas apresentaram título de anticorpos neutralizantes contra o vírus. Os dois animais exibiram o mesmo título de 1:320 no dia 50, contudo a coelha 02 diminuiu o título para 1:160 e o qual ficou estabilizado até o dia 78. Já a coelha 01 manteve seu título de 1:320 até o dia 71, no dia 78 após inoculação, o título aumentou para 1:480 (Figura 12).

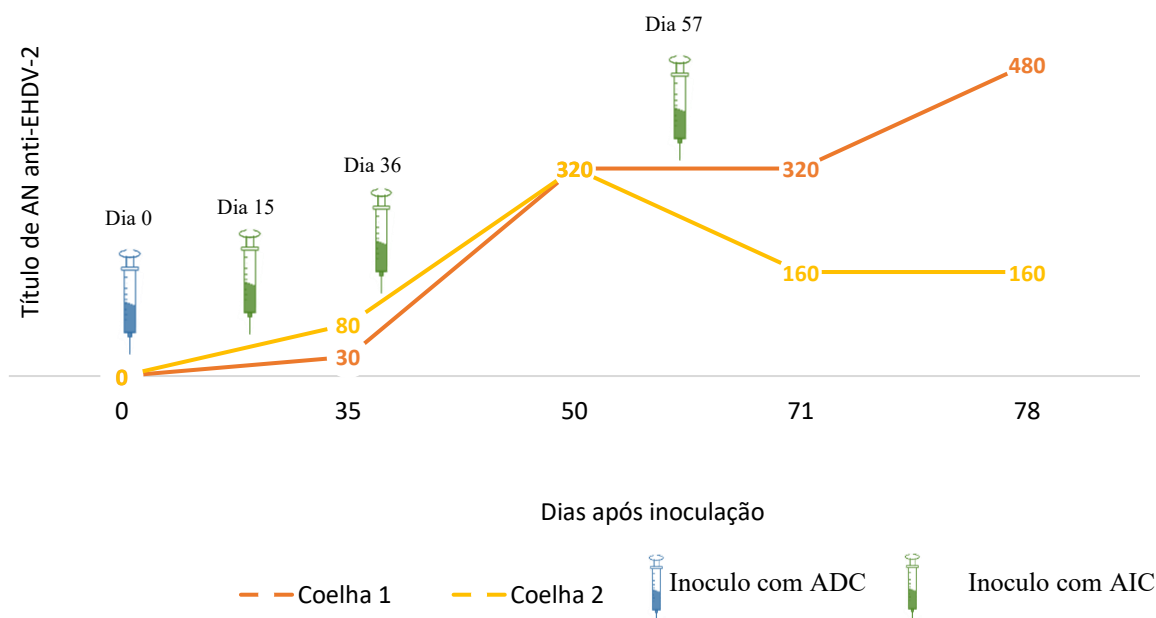


Figura 12: Perfil da produção de anticorpos no teste de soroneutralização contra o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV-2) nas coelhas imunizadas para produção de soro hiperimune. AN: Anticorpos neutralizantes. ADC: Adjuvante completo de Freud. AIC: Adjuvante Incompleto de Freud.

Neste trabalho os animais apresentaram AcN no período e título de anticorpos esperados, sendo estes detectados a partir do dia 35 após a inoculação. Estudos mostram que resposta imune humoral contra o vírus da língua azul e EHDV, com a produção de anticorpos neutralizantes (AcN), ocorre a partir do 7º a 14º dia após a infecção (Foster et al., 1991). Contudo, Stottet al. (1985) demonstraram que administração do vírus da LA inativado pode acarretar ausência ou reduzir títulos de AcN, sendo que quando aplicado

vivo ou quando utilizado junto ao adjuvante de Freund, estimula a produção de anticorpos no organismo.

No presente estudo, o IDGA foi utilizado como ferramenta de monitoramento do esquema de imunização empregado para produção do soro hiperimune que indicou a presença de anticorpos no soro das coelhas em diferentes tempos de inoculação. O IDGA é muito utilizado como teste de triagem para BTV e EHDV. Porém, apresenta pouca sensibilidade e pequena porcentagem de falsos positivos por reação cruzada entre orbivírus (Della-Porta et al., 1985; Wilson et al., 2015). A menor sensibilidade do IDGA pode ser explicada em parte pelo mecanismo de interação antígeno-anticorpo, pois embora os testes imunoenzimáticos requeiram a ligação de somente um epítipo, para obter um resultado positivo a precipitação em gel de ágar requer interações múltiplas antígeno-anticorpo (Celer Junior et al., 1998).

#### 5.1.4 Purificação de anticorpos IgG

Na purificação dos anticorpos, foram utilizados 10 mL do soro da coelha 01, pois foi a que apresentou melhor título de AcN, obtendo-se 3 mL de purificado. Este material foi quantificado pelo método de Bradford, onde se verificou a concentração de 3,0 mg/mL de proteína.

A produção dos anticorpos foi essencial para padronização das técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência, além de que não há mais anticorpos anti-EHDV comerciais para serem utilizados.

#### 5.2 Amostras dos cervídeos e avaliação histopatológica

As doenças hemorrágicas virais, LA e DHE, são uma das mais importantes enfermidades em cervídeos no Brasil, pois tem atingido 40% do rebanho de cervos em cativeiros e acarretando até no óbito destes animais (Arita et al., 1997; Kawanami, 2014). Já foram identificados cervos positivos para o vírus da LA por RT-qPCR do criatório científico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) em São Paulo

(Kawanami, 2014; Kawanami, 2016). Além disso, no criadouro CASIB, em 2015 a 2016, têm sido realizados o diagnóstico dos animais que vieram a óbito com doença hemorrágica e já tendo sido identificado e isolado diferentes sorotipos de BTV (BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22) (Baldini et al., 2018).

Os tecidos dos animais deste estudo apresentaram lesões sugestivas de doença hemorrágica viral com hemorragia sistêmica e generalizada em todos os órgãos. No resultado do RT-qPCR, dos nove animais, dois foram negativos, um positivo para BTV-4, um para EHDV-2, cinco para EHDV-1 e um dos cervídeos tinha co-infecção (Tabela 1).

Dos seis animais positivos para EHDV pela técnica de RT-qPCR, dois animais eram jovens, enquanto quatro eram adultos. De acordo com estudos, os anticorpos maternos contra o vírus da língua azul e do EHDV permanecem por seis meses nos organismos dos filhotes de veado-da-cauda-branca mantendo-os protegido (Gaydos et al., 2002b). Contudo, os animais deste estudo, vieram ao óbito com menos de sete dias de curso clínico e são mais velhos que 6 meses. Assim, mesmo em uma área endêmica, os cervos infectados por EHDV são fatalmente afetados, com taxa de 100% de mortalidade, sendo muito susceptíveis ao vírus. Esses mesmos dados foram identificados no trabalho de Kawanami (2016), onde quatro animais jovens com mais de 6 meses de idade, vieram ao óbito e positivos para BTV. Também foi compatível com trabalho de Baldini et al. (2018), em que os animais afetados do criadouro CASIB eram mais velhos e positivos para BTV, contudo vieram ao óbito antes de soroconverterem.

Os cervídeos vieram a óbito no período de março a junho, o mesmo observado nos estudos de Baldini (2018) com os cervídeos infectados com BTV no CASIB. No trabalho de Kawanami (2016), quatro cervídeos infectados com o vírus da LA vieram a óbito, em um período próximo, nos meses de janeiro e fevereiro. Essa época apresenta um clima quente e chuvoso que é favorável para o crescimento dos vetores biológicos e consequentemente maiores chances da ocorrência do surto de doenças hemorrágicas (Mellor et al., 2000).

Os animais utilizados neste estudo, tiveram os principais achados macroscópicos observados e relatados pelo Dr. Zalmir Cubas, médico veterinário responsável do CASIB

e do zoológico da Itaipu Binacional, sendo os laudos de necropsia cedidos para o enriquecimento do estudo. As lesões anatomopatológicas foram: edema submandibular, hemoperitônio, hemotórax, conteúdo sanguinolento no intestino com hemorragia intestinal, pulmão hemorrágico, petéquias no miocárdio, hemopericárdio, baço com hemorragia e rins hemorrágicos e congestos. Estas lesões encontradas são compatíveis com as descritas na literatura. Favero et al. (2013) descreve que os veados-bororós acometidos com EHDV apresentaram cianose e petéquias na mucosa oral, língua e mucosa gastrointestinal, na bexiga e no endocárdio e alças intestinas, e baço e linfonodos hemorrágicos. Lesões similares também foram descritas por Ruder et al. (2015), em veados-de-cauda-branca, que apresentaram no quarto dia de infecção, hemorragias generalizadas no músculo esquelético, no baço, no coração, na adventícia da artéria pulmonar, parede ruminal, com linfonodos aumentados e hemorrágicos, e edema pulmonar grave com hemorragia.

Em relação as lesões microscópicas, no presente estudo as principais alterações generalizadas identificadas foram hiperemia, hemorragia, edema e infiltrado inflamatório, predominantemente linfocítico ou linfoplasmocitário tendo em alguns a presença de macrófagos (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação da intensidade das principais alterações histopatológicas em órgãos coletados de cervídeos que vieram a óbito em 2017 e positivos no RT-qPCR para EHDV.

Identificação dos animais	Coração	Pulmão	Baço	Linfonodo	Rim	Bexiga	Testículo	Encéfalo	Fígado	Pâncreas	Intestino	Rúmen	Reticulo	Omaso	Abomaso
<b>Hiperemia</b>															
NEC 2624	++	/	++	++	++	++	-	/	+++	+++	++	-	/	/	/
NEC 2630	+	+++	+++	+++	+++	++	++	/	+++	+	++	/	+	++	++
NEC 2634	-	+++	+	/	+	+	-	/	+	++	++	-	-	-	-
NEC 2637	-	+++	++	/	++	-	/	++	++	/	/	/	/	/	/
NEC 2640	-	++	+++	++	++	+	/	/	++	/	+	-	/	-	/
NEC 2644	++	++	+++	/	+++	+++	/	++	++	/	-	-	-	-	-
<b>Hemorragia</b>															
NEC 2624	++	/	++	++	++	-	-	/	++	++	-	-	/	/	/
NEC 2630	-	+++	+++	+++	+	+++	++	/	+++	-	+	/	-	-	+
NEC 2634	-	++	+	/	-	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-
NEC 2637	-	++	+++	/	+	-	/	-	+	/	/	/	/	/	/
NEC 2640	-	++	+++	++	++	-	/	/	+	/	-	-	/	-	/
NEC 2644	+	+	+++	/	+	++	/	-	+	/	-	-	-	-	-
<b>Edema</b>															
NEC 2624	-	/	-	-	-	-	-	/	+	-	+	-	/	/	/
NEC 2630	-	+++	-	++	-	++	+	/	++	-	-	/	-	-	-
NEC 2634	-	+	-	/	-	-	-	/	+	-	+	-	-	+	-
NEC 2637	-	+	-	/	-	-	/	-	+	/	/	/	/	/	/
NEC 2640	-	+	-	-	-	-	/	/	-	/	-	+	/	-	/
NEC 2644	-	+++	-	/	+++	++	/	-	-	/	-	-	-	-	-
<b>Processo inflamatório</b>															
NEC 2624	+	/	-	-	+	-	++	/	++	-	++	-	/	/	/
NEC 2630	-	+++	-	-	-	-	+	/	+	-	+	/	-	+	-
NEC 2634	-	++	-	/	+	-	++	/	-	-	-	-	-	-	-

<b>NEC 2637</b>	-	+++	-	/	-	-	/	-	+	/	/	/	/	/	/
<b>NEC 2640</b>	-	++	-	-	-	-	/	/	+	/	++	-	/	-	/
<b>NEC 2644</b>	-	++	-	/	-	-	/	+	-	/	-	-	-	-	-

EHDV: Vírus da Doença Epizootica Hemorragica

NEC: Identificação da necropsia

ZOO: Zoológico Roberto Ribas Lange

/ : Órgão ausente

- : Ausência de alteração no tecido

+ : Alteração discreta a leve

++ : Alteração moderada

+++ : Alteração intensa

Das análises histológicas dos cervídeos positivos para EHDV no RT-qPCR deste estudo, foram observadas alterações no baço, rim, fígado, pulmões, testículos, pâncreas, encéfalo, linfonodo, bexiga, intestino, coração, abomaso, omaso, retículo e rúmen (Tabela 7). Essas lesões sistêmicas, foram compatíveis com o do primeiro relato de DHE em veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), no estado de Michigan nos EUA, em que observaram vários órgãos com lesões hemorrágicas, sendo entre eles: o baço, linfonodos, rins, estômago, intestino, coração, pulmão e fígado. Assim, concluíram que uma característica patológica do vírus era causar uma doença sistêmica e generalizada (Shope et al., 1960).

Tabela 7: Órgãos em que foram observadas alterações histopatológicas de animais positivos para EHDV no RT-qPCR.

Órgãos	Quantidade afetada	Porcentagem
Baço	6/6	100%
Fígado	6/6	100%
Rim	6/6	100%
Pulmão	5/5	100%
Testículo	3/3	100%
Pâncreas	3/3	100%
Linfonodos	2/2	100%
Encéfalo	2/2	100%
Bexiga	5/6	83,3%
Intestino	$\frac{3}{4}$	75%
Coração	4/6	66,6%
Omaso	2/4	50%
Reticulo	1/3	33,3%
Abomaso	1/3	33,3%
Rúmen	$\frac{1}{4}$	25%

Em um estudo retrospectivo patológico de com amostras de cervos neotropicais no Brasil, *Blastocerus dichotomus* e *Mazama gouazoubira*, também foram observadas lesões hemorrágicas sistêmicas sugestivas de orbivírus, predominante nos pulmões, língua, rim e fígado, contudo menos frequentemente nos intestinos, na bexiga e nas gônadas (Navas-Suárez et al., 2018).

Os cervídeos *M. Nana* são muito sensíveis aos orbivírus, assim vão a óbito com lesões hemorrágicas em menos de sete dias de infecção. Essa avaliação foi feita por Baldini et al. (2018), em que os *M. Nana*, no refúgio de Bela Vista, Itaipu Binacional, da mesma origem dos animais deste estudo, também vieram a óbito em menos de sete dias com sinais de doença hemorrágica. Nesse mesmo estudo, o levantamento sorológico por IDGA mostrou títulos baixos ou até ausência de anticorpos, sendo positivos para o RT-qPCR e com intensas lesões hemorrágicas. Assim, deduziu-se que seriam animais altamente sensíveis e vieram a óbito antes de produzirem título de anticorpos suficientes para o diagnóstico por IDGA. Em outro relato sobre infecção por EHDV, em cervídeos com infecção aguda por EHDV sobreviveram o suficiente para começar a ter uma resposta humoral com IgM, contudo morreram antes de 7 a 10 dias e de apresentarem concentrações detectáveis de anticorpo IgG (Scott et al., 1998).

Em uma infecção experimental em veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) com o EHDV-6 foram observadas alterações típicas de DHE e LA. Após o 4º dia de inoculação, havia edema pulmonar e hemorragias em uma variedade de órgãos, incluindo trato gastrointestinal, pulmão, baço, artéria pulmonar, timo, coração, rim, linfonodo, testículo, medula óssea e cérebro. Verificou-se, ainda, um leve infiltrado perivascular, principalmente neutrofílico na pele, nos órgãos gastrintestinais, no testículo, e no cérebro (Ruder et al., 2015). Esse achado é semelhante ao encontrado em algumas amostras de coração deste estudo, em que havia presença de infiltrado perivascular neutrofílico e linfocítico. Contudo, o tecido cardíaco apresentou ausência ou presença de alterações histopatológicas discretas. As lesões eram observadas no endocárdio e nos vasos no miocárdio, principalmente discretas hiperemias e hemorragias (Figura 13-A).

Nos estudos de Ruder et al. (2015), as lesões observadas entre o quarto ao 12º dia após aplicação no inóculo foram similares, contudo, mudou o infiltrado de neutrofílico para linfoplasmocítico e intensificou-se a hemorragia generalizada.

Os cervídeos deste trabalho vieram a óbito com menos de uma semana após os primeiros sinais clínicos e as alterações são compatíveis com as observadas por Ruder et al. (2015), onde na maioria dos órgãos foi verificada extensa hemorragia e infiltrado linfoplasmocítico.

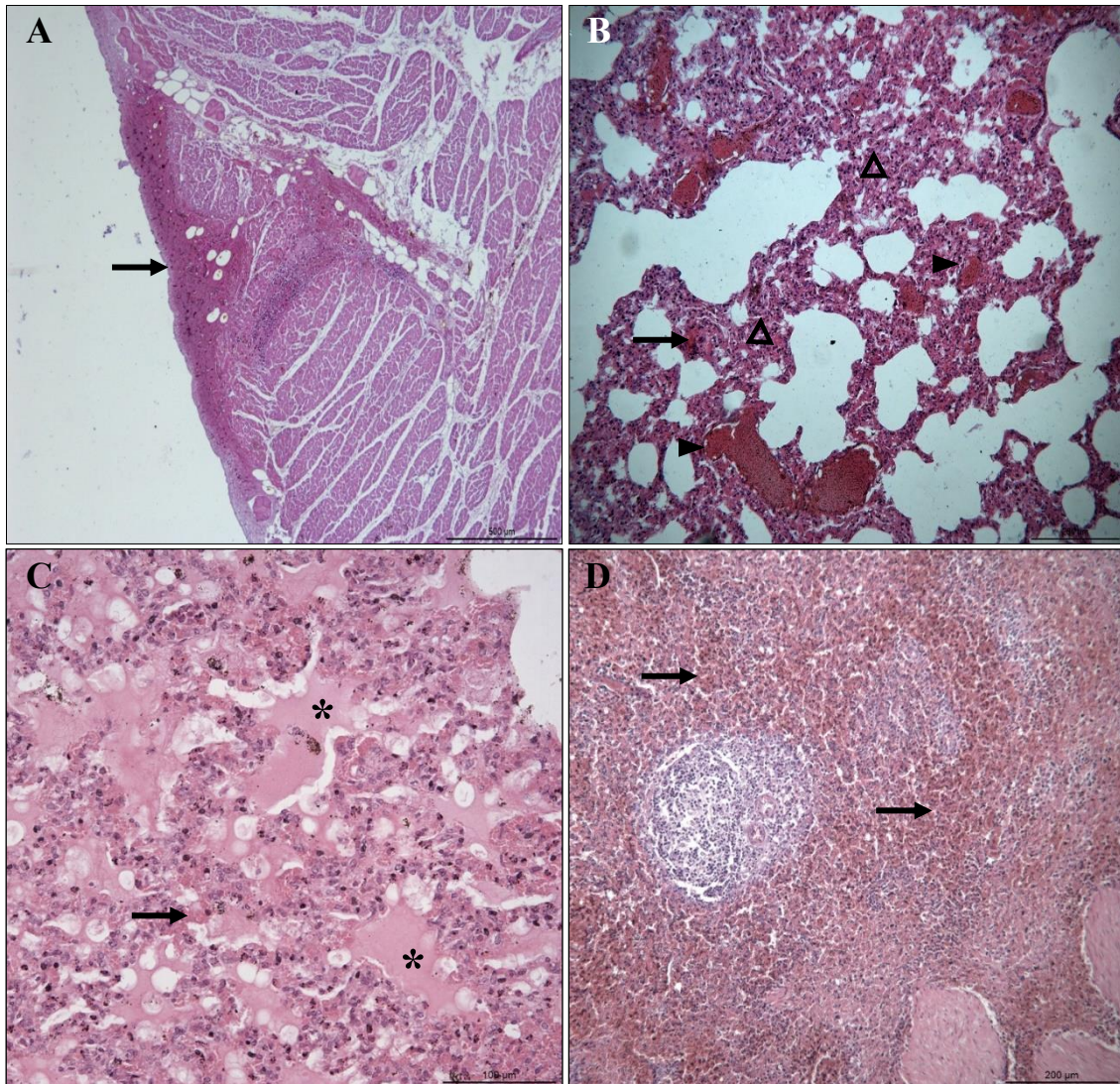


Figura 13: Histopatologia das principais lesões encontradas em cervídeos infectados com EHDV. A: coração. Hemorragia no endocárdio. H&E. (50x). B: pulmão. Espessamento dos septos com hemorragia e hiperemia. H&E. (100x). C: pulmão. Intensa presença de um material amorfo, acelular e eosinofílico dentro dos alvéolos (edema) com discreta a moderada hiperemia e hemorragia. H&E. (200x). D: baço. Expansão da polpa vermelha por hiperemia e congestão dos vasos. H&E. (100x). A seta (→) indica a hemorragia, cabeça da seta (▶) hiperemia, asterisco (\*) o edema e o triângulo (Δ) um infiltrado inflamatório.

Na maioria das amostras de pulmões, havia um difuso processo inflamatório por todo septo interalveolar que se caracteriza pela diminuição dos espaços alveolares com espessamento dos septos. O processo inflamatório foi agudo, difuso, intersticial e

linfoplasmacítico com presença também de macrófagos. Houve hiperemia intensa, com moderada hemorragia e foi observada discreta presença de um material amorfo, acelular e eosinofílico dentro dos alvéolos (edema) (Figura 13-B, C).

Todas as amostras de baço apresentaram uma intensa hiperemia e hemorragia por toda a polpa vermelha (Figura 13-D) e algumas áreas apresentaram-se com pigmentos amarronzados sugestivos da presença de hemossiderina no tecido conjuntivo. Que é similar com observado em trabalhos anteriores (Shope et al., 1960; Maclachlan et al., 2015) em que há um acúmulo de eritrócitos no parênquima do baço e dos linfonodos devido a intensa hiperemia e hemorragia dos vasos. Nos animais deste trabalho, no baço também foi visualizado poucos folículos linfoides reativos com formação de centro germinativo.

Nos linfonodos observou-se uma intensa hiperemia nos seios medulares e uma moderada hiperemia e hemorragia difusa na região cortical (Figura 14-A). Um número reduzido de folículos linfoides reativos e de linfócitos foi observado.

Neste estudo, foi analisado redução dos folículos linfoides reativos e linfócitos no parênquima do baço e linfonodo. Este dado é condizente com Quist et al. (1997) que demonstraram que os cervos-de-cauda-branca infectados com o EHDV ou o BTV apresentavam redução da contagem dos linfócitos e da proliferação de células T durante a fase aguda da infecção. Foi observada a supressão da multiplicação de linfócitos devido a uma inibição seletiva da transdução do sinal do receptor de IL-2. Esta falta da proliferação de célula T após as infecções de EHDV e de BTV pode causar uma deficiência imune transitória e os animais se tornarem susceptíveis a infecções secundárias.

Na maioria dos tecidos renais, verificou-se uma hiperemia de grau moderado a intenso nos vasos dos glomérulos e no tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos contorcidos e coletores da região cortical e medular, respectivamente (Figura 14-B, C). Enquanto na bexiga, observou-se moderada edema no epitélio e hiperemia e hemorragia na submucosa (Figura 14-D).

Na maioria das amostras de fígado houve uma moderada a intensa hiperemia dos vasos sanguíneos entre os sinusóides e no sistema porta com presença de processo

inflamatório moderado perivascular composto de linfócitos e discreta hemorragia (Figura 15-A).

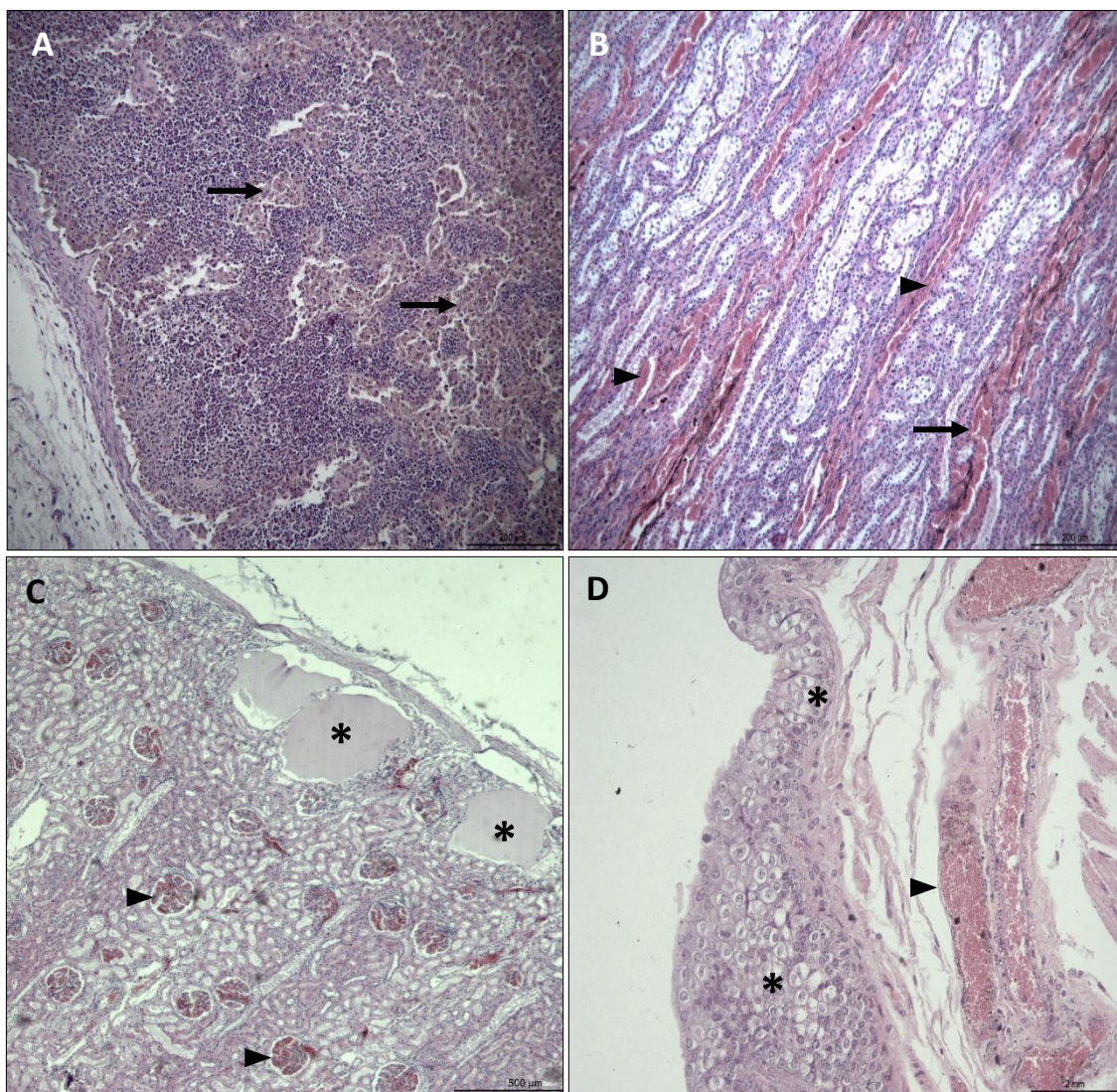


Figura 14: Histopatologia das principais lesões encontradas em cervídeos infectados com EHDV. A: linfonodo. Hemorragia intensa na região cortical. H&E. (100x). B: rim. Região medular com intensa hiperemia. H&E. (100x). C: rim. Edema na região cortical logo abaixo da cápsula renal e hiperemia nos glomérulos. H&E. (50x). D: bexiga. Edema no epitélio e hiperemia na submucosa. H&E. (400x). A seta (→) indica a hemorragia, cabeça da seta (▶) hiperemia e o asterisco (\*) o edema.

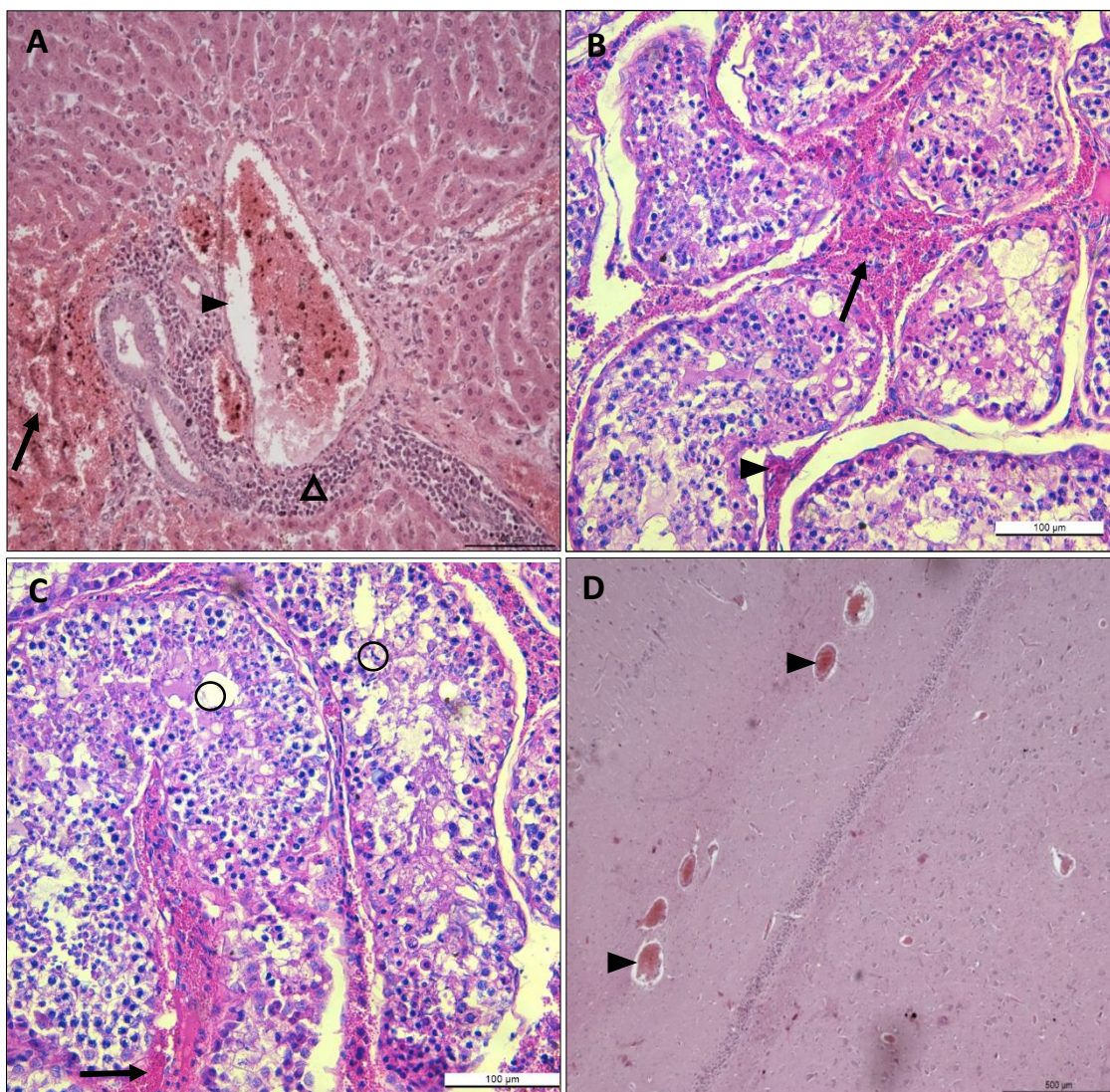


Figura 15: Histopatologia das principais lesões encontradas em cervídeos infectados com EHDV. A: fígado: hemorragia intensa, hiperemia e infiltrado inflamatório linfocitário no sistema portal. H&E. (200x). B: testículo. Moderada hiperemia e hemorragia no interstício com degeneração dos túbulos seminíferos. H&E. (200x). C: testículo. Moderada hemorragia no interstício com degeneração dos túbulos seminíferos. H&E. (200x). D: encéfalo. Discreta hiperemia. H&E. (50x). A seta (→) indica a hemorragia, cabeça da seta (▶) hiperemia, o triângulo (Δ) um infiltrado inflamatório e o círculo (○) degeneração celular.

No testículo, observou moderado infiltrado linfocítico difuso no interstício com leve a moderada hiperemia, hemorragia e edema, características (Figura 15-B, C). Isso difere dos estudos de Fox et al. (2015), em que veados-mula (*Odocoileus hemionus*)

infectados com EHDV, foram descritas lesões de degeneração testicular crônica severa junto com uma orquite, vasculite, edema e alguns casos, mineralização. Esses animais apresentavam alterações crônicas resultantes de danos vasculares e pela inflamação. Já no trabalho de Ruder (2015), também foi identificado lesões agudas com presença de hemorragias e hiperemias. Assim, os animais deste estudo tiveram lesões hiperagudas e não viveram tempo suficiente para formação de alterações de mineralização.

Nos animais deste trabalho, nenhum animal apresentou relatos de sinais neurológicos mesmo que no encéfalo foram observadas poucas alterações microscópicas, caracterizadas por uma discreta a moderada hiperemia nos vasos (Figura 15-D). Nos estudos de Quist et al. (1997) verificaram que dois veados-de-cauda-branca, infectados com EHDV-6, apresentaram tremores da cabeça, e na análise histopatológica verificaram um leve infiltrado e pequenas áreas com hiperemias dispersadas aleatórias por todo cérebro.

Nos órgãos gastrointestinais (rúmen, omaso, retículo, abomaso e intestino) houve uma moderada hiperemia na submucosa e discretos hemorragia, edema e infiltrado linfocitário.

Neste estudo, não foi visualizado trombos na microscopia, embora haja hiperemia, hemorragia, e inflamação em tecidos afetados, que é típico para a infecção com EHDV e BTV, e presença de trombos como alteração macroscópica de um dos animais acometidos. O vírus da doença hemorrágica epizootica causa lesões microvasculares difusas devido à replicação nas células endoteliais, causando o consumo das plaquetas, trombocitopenia, e coagulação intravascular disseminada (DIC) que contribui para a hemorragia e formação de trombos que já é bem discutida na literatura (Sai and Karstad, 1978; Ruder et al., 2015). Como os animais deste estudo tiveram uma infecção hiperaguda, possivelmente não houve tempo para formação de trombos.

Os resultados encontrados são uma evolução nos estudos dos vírus de LA e DHE em cervídeos brasileiros, mas há necessidade de mais estudos nesta linha de pesquisa. Pois a maior parte do território brasileiro é considerado endêmico para LA (Lobato et al., 2015), contudo ainda existe poucas informações sobre a distribuição e ocorrência das orbivirose no Brasil.

Além disso, assim como em Itaipu Binacional, desde 1990, e outras diversas regiões do Brasil, vários cervídeos morrem com sinais clínicos sugestivos de doença hemorrágicas, mas não se tem sido feito o diagnóstico para identificar o agente etiológico (Duarte et al., 2012). Assim, é necessário o desenvolvimento de melhores métodos de diagnósticos para serem realizados estudos retrospectivos do vírus da DHE e LA dos animais que já vieram ao óbito.

### **5.3 Imuno-histoquímica**

A padronização do método de imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada através de testes variando a diluição do anticorpo policlonal de coelho anti-EHDV-2, o bloqueio, o tempo de incubação e a solução de recuperação antigênica. A diluição do anticorpo primário que apresentou os melhores resultados foi de 1:30 incubando à 4°C por 18 horas.

Nos controles não foi verificada marcação quando foram adicionados os mesmos anticorpos primários em cortes de tecidos de animais negativos para EHDV-2, no RT-qPCR, ou quando substituídos com soro negativo de coelho ou PBS 1X.

Devido ao formol tamponado ser o método de fixação dos tecidos mais utilizado e difundido na rotina de diagnóstico por seu baixo custo e disponibilidade, o pré-tratamento e o armazenamento dos órgãos (Ramos-Vara, 2005) devem ser adequados para permitir estudos imuno-histoquímicos. Como a fixação em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos aminos, a recuperação antigênica (RA) é necessária para quebrar essas ligações e expor os epítomos alvos para o acesso dos anticorpos na IHQ. Assim, para a melhor RA é necessário um pH baixo, temperaturas elevadas, pressão e soluções químicas (Kim et al., 2003).

O tampão citrato com pH 6,0 em temperatura de 96°C por 45 minutos apresentou os melhores resultados na RA neste estudo, como já verificado em outros trabalhos com IHQ para BTV (Sánchez-Cordón et al., 2010) e EHDV (Mills et al., 2017). Há outros métodos de recuperação antigênica utilizando calor para expor os antígenos, podendo ser usado autoclave (Bankfalvi et al. 1994), panela de pressão (Miller and Estran 1995),

microondas (Imam et al. 1995) ou banho-maria (Kawai et al. 1994). No presente estudo a panela a vapor com água aquecida a 96°C apresentou excelente resultado.

Em relação a solução de bloqueio, o leite em pó diluído à 2% em PBS e deixado incubando por 45 minutos na estufa foi o melhor método para retirar o máximo de reações inespecíficas.

Na IHQ houve marcação em todos os órgãos selecionados e avaliados, sendo estes, o baço, pulmão, testículo, coração, fígado, linfonodo e rim (Tabela 8). As marcações dos antígenos virais contra EHDV foram intracitoplasmáticas avermelhadas, enquanto as colorações não associadas à células foram desconsideradas e caracterizadas como reações de fundo.

Neste estudo, as marcações foram bem evidentes em células mononucleares, macrófagos e linfócitos. A imunomarcação em células endoteliais foram mais fracas e em menor número, mesmo tendo sido constatadas lesões de hemorragia e hiperemia. Essas observações são consistentes com os trabalhos de MacLachlan et al. (1990) e Lee et al. (2011), em estudos de infecções experimentais de BTV em bezerros e ovelhas, respectivamente. Nesses estudos, foi predominantemente encontrada imunomarcação em células mononucleares e apenas muito raramente no endotélio vascular, podendo ser indicativo do vírus causar uma destruição direta dos vasos por meio de mediadores vasoativos ou pela sensibilidade insuficiente do procedimento de IHQ.

Estudando o processo de padronização de IHQ para o BTV, Sánchez-Cordón et al. (2010), observaram pulmão, baço e linfonodos como os órgãos mais marcados em ovelhas e caprinos, sendo a imunomarcação principalmente evidenciada em células endoteliais das arteríolas e capilares. Os resultados de Kamomae et al. (2018) também demonstraram muitas marcações para EHDV-6 nas células dos vasos da camada muscular do estômago de bovinos. Esses trabalhos diferem das características das principais marcações visualizadas neste estudo em linfócitos e macrófagos.

Como analisado neste estudo, o grau de marcações na IHQ não foi compatível com os valores de ciclo limiar (Ct) do RT-qPCR, sugerindo que pode não haver correlação entre a quantidade de RNA no tecido e o número de células infectadas com antígenos protéicos de EHDV (Tabela 8). Scott et al. (1998) tiveram dificuldade de detectar

antígenos virais de EHDV na imuno-histoquímica e do RNA viral na hibridização *in situ*, possivelmente como resultado do baixo número de células infectadas e/ou reduzidos níveis de replicação de vírus. Isso pode ser devido tanto a ausência ou baixa presença de células infectadas no tecido ou pelo fato de que o vírus está principalmente no sangue dos animais infectados em leucócitos ou pelas membranas dos eritrócitos (Dangler et al., 1990). Assim, como o RT-qPCR é realizado através de amostras frescas maceradas estando bastante hemorrágicas, é possível que alta quantidade de RNA viral identificada tenha sido advinda do sangue periférico infectado presente nestes órgãos processados.

Além disso, o método de fixação por formol e inclusão na parafina são preferíveis para preservação da morfologia dos tecidos, contudo podem acarretar a perda da antigenicidade das amostras (Sánchez-Cordón et al., 2010). Assim, a imuno-histoquímica pode perder sensibilidade para identificação das proteínas virais que podem estar degradadas em comparação ao PCR de órgãos que foram processados imediatos e ainda frescos, em que há uma perda pequena do material genético. Sendo que o PCR em tempo real é uma técnica bem mais sensível que a IHQ (Wilson et al., 2015), em que precisa de um número baixo de carga viral para ser detectado a amostra como positivo.

As diferenças do resultado da IHQ e RT-qPCR, podem ser tanto devido à degradação dos antígenos virais, no processamento ou devido a quantidade de material genético no tecido que não apresenta correlação direta com a quantidade de proteínas virais extressas.

As marcações de IHQ foram compatíveis com os órgãos que apresentaram mais lesões, como o pulmão, baço, fígado e rim. Assim, podemos sugerir que estes tecidos mencionados são de eleição para diagnóstico por meio da IHQ para EHDV.

Tabela 8: Avaliação das marcações pela imuno-histoquímica de todos os cervídeos que vieram a óbito em 2017 e positivos para EHDV e correlacionando com os valores de limiar (Ct) de ciclo de cada órgão.

Identificação do animal	Órgão	Grau de marcação	Distribuição	Diagnóstico e sorotipo	RT-qPCR	CT*
NEC 2624	Coração	+	Pontual	EHDV-1	P	20,26
	Baço	+	Pontual		P	17,80
	Fígado	+++	Multifocal a difusa		P	22,04
	Linfonodo	++	Multifocal		P	18,56
	Testículo	++	Pontual		NR	NR
	Rim	++	Pontual		P	23,43
NEC 2630	Coração	-		EHDV-2	P	25,60
	Baço	++	Pontual		P	23,83
	Fígado	++	Pontual		P	26,78
	Linfonodo	++	Pontual		NR	NR
	Pulmão	+++	Multifocal a difusa		P	22,39
	Testículo	+++	Pontual a multifocal		NR	NR
NEC2634	Rim	+++	Multifocal a difusa	EHDV-1	P	25,80
	Coração	+	Pontual		P	18,46
	Baço	+++	Multifocal		P	21,96
	Fígado	+	Pontual		P	17,12
	Pulmão	++++	Multifocal a difusa		P	23,25
	Testículo	+	Pontual		NR	NR
NEC 2637	Rim	++	Multifocal	EHDV-1	P	18,33
	Coração	-			P	18,79
	Baço	++	Pontual		P	22,45
	Fígado	+	Pontual		P	20,51
	Pulmão	++++	Multifocal a difusa		P	39,54
NEC 2640	Rim	++	Pontual	EHDV-1	P	18,48
	Coração	+	Pontual		P	17,83
	Baço	++	Pontual		P	19,17
	Fígado	+	Pontual		P	17,22
	Linfonodo	+	Pontual		NR	NR
NEC 2644	Pulmão	++	Multifocal	EHDV-1	NR	NR
	Rim	+	Multifocal		P	18,59
	Coração	+	Pontual		NR	NR
	Baço	+++	Multifocal		P	29,73
	Fígado	+	Pontual		P	27,00
	Pulmão	+++	Multifocal a difusa		P	25,48
	Rim	+	Multifocal		P	22,71

EHDV: Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica

NEC: Identificação da necropsia

ZOO: Zoológico Roberto Ribas Lange

CT: Valor do limiar de ciclo no RT-qPCR

NR: Não realizado

P: Positivo

\*Ponto de corte de 35

Grau da imuno-histoquímica:	++ : Marcação de leve a moderada
- : Ausência de marcação no tecido	+++ : Marcação moderada intensa
+ : Marcação discreta a leve	++++: Marcação intensa

O pulmão foi o órgão que apresentou maior quantidade e intensidade das marcações, principalmente, no citoplasma das células epiteliais dos bronquíolos, macrófagos e células endoteliais dos vasos (figura 17-A, B e C). A maioria dos trabalhos não relata imunomarcações nas células epiteliais dos bronquíolos (Ramos-Vara, 2005; Sánchez-Cordón et al., 2010). Assim, estes achados sugerem que as espécies de cervídeos *Mazama nana* quanto o *Blastocerus dichotomus* infectadas com EHDV podem apresentar infecção das células epiteliais no pulmão.

Nos rins, ocorreu imunoreação em células endoteliais nos glomérulos e vasos sanguíneos, e nas células epiteliais dos túbulos contorcidos e coletores (figura 16-B e D).

Em um estudo *in vitro*, células da linhagem celular humana epitelial brônquica (A549) foram susceptíveis a infecção por BTV-4 e BTV-8. Estas células epiteliais infectadas foram induzidas a produzir interferon beta (IFN- $\beta$ ) e tipo I (IFN-I) devido à infecção viral e mostrou que o BTV pode ativar os fatores de transcrição IRF3 e NF- $\kappa$ B e induzir a produção de IFN- $\beta$  juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias (Chauveau et al., 2012). Com este trabalho, podemos deduzir que as células epiteliais dos bronquíolos nos pulmões e dos túbulos contorcidos nos rins podem também ser infectadas com o EHDV.

Nos testículos houve intensa imunomarcação em células germinativas dos cordões espermáticos e macrófagos, e linfócitos no interstício entre os túbulos seminíferos (Figura 17-D, E e F). Não há relatos na literatura sobre a identificação de células germinativas infectadas com BTV e EHDV, contudo há relatos em que a infecção por estes orbivírus causa intensa degeneração dos túbulos seminíferos e que afeta a espermatogênese tanto de cervídeos como em ovinos (Fox et al., 2015, Ruder et al., 2015). Assim, observamos que os cervídeos *Mazama nana* quanto o *Blastocerus dichotomus* infectados com EHDV apresentam degeneração testicular que poderá levar à uma provável infertilidade, compatível com estudos Puggion et al. (in press) em ovinos experimentalmente infectados com BTV.

Em alguns estudos foram identificadas marcações contra BTV condizentes com os achados deste estudo, principalmente, em linfócitos, monócitos e macrófagos na polpa branca do baço, em áreas alveolares dos pulmões, e por todo parênquima do timo e linfonodos (Sánchez-Cordón et al., 2010; Marín-López et al., 2016).

No baço, a visualização da imunorreação foi mais difícil, em decorrência da grande quantidade de hemácias oriundas da hemorragia e hiperemia. Contudo, verificou-se marcações em macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos vasos, tanto na polpa branca quanto vermelha (Figura 18-A, B, C e F). Nos linfonodos verificou-se imunorreações pontuais nos macrófagos e linfócitos em áreas periféricas aos folículos linfoides na região cortical e nos cordões medulares. (Figura 18-D e E).

Nos linfonodos a maioria dos macrófagos e linfócitos imunomarcados contra BTV na IHQ estavam na borda dos folículos linfóides (áreas de células T), e poucos estavam no centro germinativo dos folículos (áreas de células B). Essa informação sugere que os linfócitos T são mais susceptíveis a infecção por orbivírus do que os linfócitos B (Sánchez-Cordón et al., 2010; Marín-López et al., 2016). Já foram identificados, em testes *in vitro* com citometria de fluxo, leucócitos susceptíveis ao BTV tendo a seguinte ordem de sensibilidade ao vírus: macrófagos, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e linfócitos B (Barratt-Boyes et al., 1992). As marcações encontradas na zona marginal do baço são similares ao estudo de Lee et al. (2011), que identificaram por evidências moleculares e morfológicas o BTV, provavelmente associada à infecção aguda do animal acometido.

Nos tecidos hepáticos, foram marcados hepatócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais (figura 16-A e C). Estes achados corroboram com Sánchez-Cordón et al., (2010) que identificaram a infecção de hepatócitos e células de Kupffer por orbivírus no fígado de ovelhas e caprinos.

O tecido cardíaco apresentou poucas marcações ou mesmo ausência de imunomarcção. As escassas imunoreações, quando observadas, eram em células do endotélio dos vasos no endocárdio e/ou miocárdio. Estes resultados foram semelhantes de Sánchez-Cordón et al., (2010), em que o tecido cardíaco apresentou discreta imunomarcção em células infectadas com BTV em caprinos e ovinos.

Os resultados obtidos indicam que o coração não é um órgão de eleição para o teste de IHQ para EHDV. Na tabela 8, podemos observar que, mesmo as amostras deste órgão que possuem um CT baixo foram negativas ou apresentaram baixa marcação na IHQ. Foi observado neste órgão poucas lesões histopatológicas que podem ter culminado na presença de menor intensidade da imunorreação. Outro fator está relacionado a presença de grande quantidade de sangue infectado presente no momento do processamento das amostras.

As reações de fundo foram mais significativas no pulmão, rim e baço. Durante o processo de padronização, foi destinado maior tempo à incubação das lâminas no peróxido de hidrogênio, diminuindo essas reações inespecíficas. Portanto, o pré-tratamento eficaz dos tecidos fixados em formalina mostrou-se eficiente para diminuir as reações indesejadas na IHQ (Ramos-Vara, 2005). É importante destacar que alguns órgãos dos cervídeos ficaram mais de um mês no formol, o que pode ter acarretado maiores reações de fundo.

Os orbivírus em geral, apresentam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e quatro proteínas não-estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3a e NS4), sendo as últimas as mais conservadas entre as diferentes estípes virais (Schwartz-Cornil et al,2008; Ratinier et al., 2011). As proteínas mais externas, principalmente a VP2 e a VP5, presentes no capsídeo viral, são muito variáveis, mas também apresentam alguns epítomos conservados na sua estrutura (Roy, 2009). Assim, os sorotipos apresentam variações antigênicas, mas possuem proteínas comuns que acarretam em reações cruzadas nos testes sorológicos.

Os anticorpos policlonais na IHQ são produzidos por vários plasmócitos, reagindo assim com diversos epítomos do vírus, podendo ser contra tanto as proteínas estruturais quanto não estruturais (Ferro, 2013). Assim, os anticorpos policlonais utilizados neste estudo, mesmo produzidos contra o EHDV sorotipo 2, podem reagir contra várias proteínas conservadas que são também identificadas no vírus do sorotipo 1. O teste de IHQ padronizado neste trabalho conseguiu identificar tanto o EHDV-1 e EHDV-2, sendo que no caso do animal infectado com este último observou que houve uma marcação com uma intensidade um pouco maior devido ao fato do soro policlonal foi produzido com o isolado de EHDV-2 (Tabela 8).

A imuno-histoquímica padronizada neste estudo foi eficiente para identificar EHDV, podendo até ser utilizado na identificação de dois tipos diferentes de sorotipo do vírus. Embora as lesões encontradas neste estudo tenham sido compatíveis com as descritas na literatura, esta é a primeira descrição detalhada de achados histopatológicos em cervídeos brasileiros infectados com EHDV, ainda sendo associada com marcações na IHQ e os resultados no RT-qPCR com material fresco.

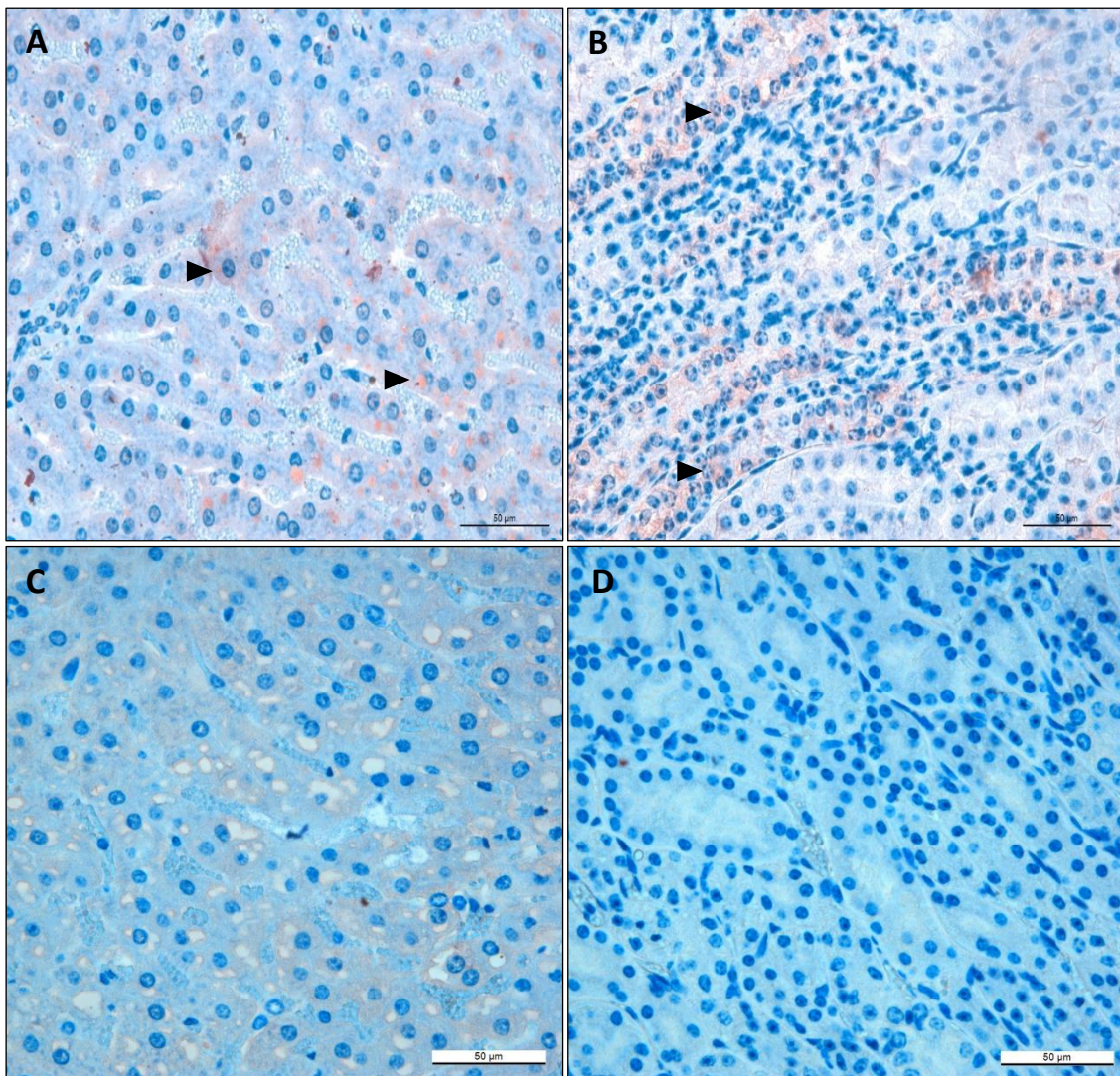


Figura 16: Imuno-histoquímica para o vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) em cervídeos que vieram a óbito por hemorragia sistêmica, em 2017. A: fígado. Hepatócitos com marcações no citoplasma e nos vacúolos (cabeça da seta) nos lóbulos hepáticos. IHQ. (400x). B: rim. Células epiteliais dos túbulos contorcidos próximos (cabeça da seta) na região cortical. IHQ. (400x). C: fígado. Animal 2626 negativo para BTV e EHDV. (400x). D: rim. Animal 2626 negativo para BTV e EHDV.

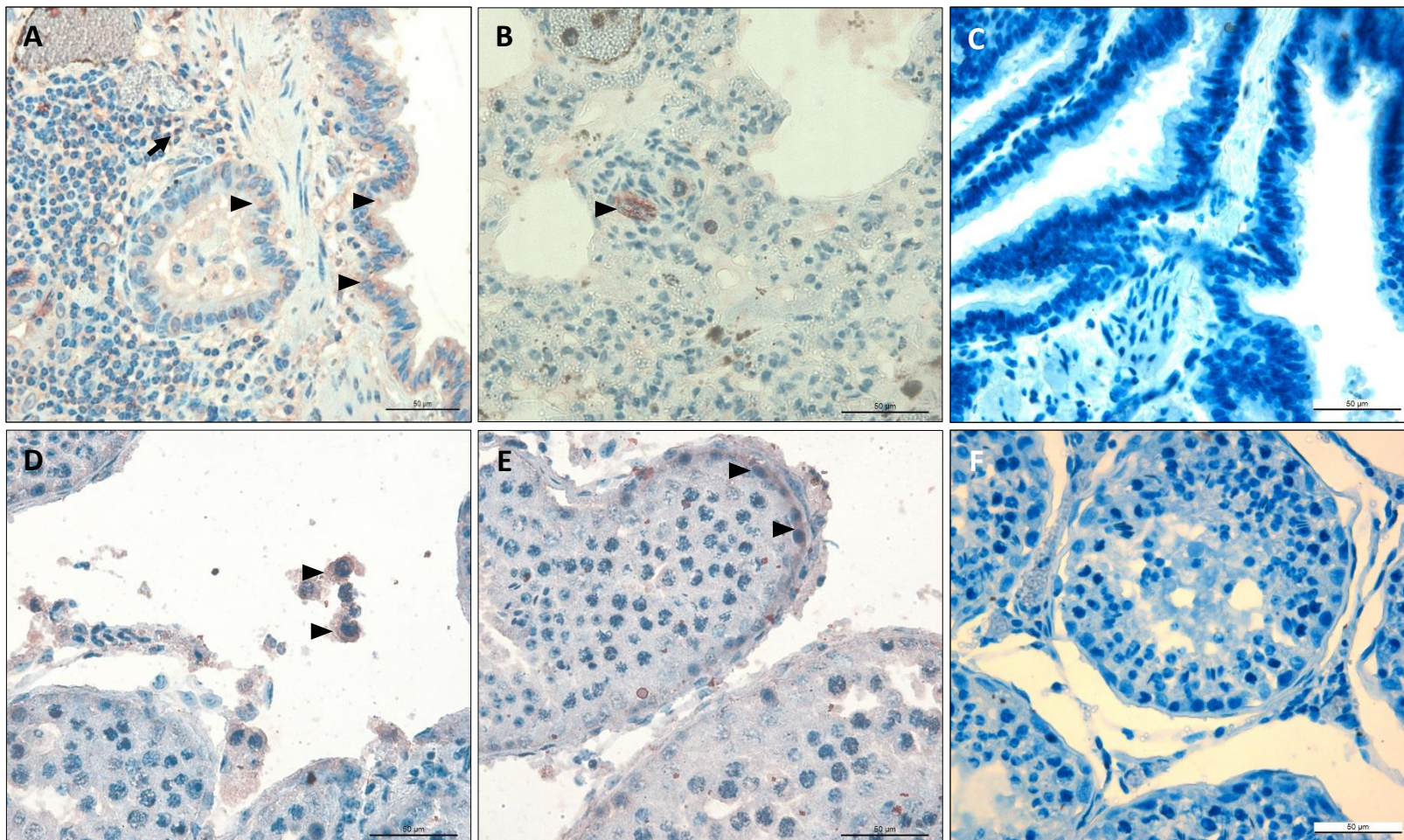


Figura 17: Imuno-histoquímica para o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) em cervídeos que vieram a óbito por hemorragia sistêmica, em 2017. A: pulmão. Intenso processo inflamatório linfocitário com marcações em alguns linfócitos (seta) e células epiteliais dos bronquíolos (cabeça da seta). IHQ. (400x). B: pulmão. Marcações para EHDV em células endoteliais dos vasos (cabeça da seta). IHQ. (400x). C: pulmão. Controle negativo utilizando soro de coelho (dia zero) soronegativo para EHDV em tecido de animal positivo para o vírus no RT-qPCR. (400x). D: testículo. Macrófago (cabeça da seta) infectado com EHDV no interstício do órgão. IHQ. (400x). E: testículo. Célula germinativa do cordão espermático infectada no túbulo seminífero (cabeça da seta). IHQ. (400x). F: testículos. Controle negativo utilizando PBS 1X em tecido de animal positivo para o vírus no RT-qPCR. (400x).

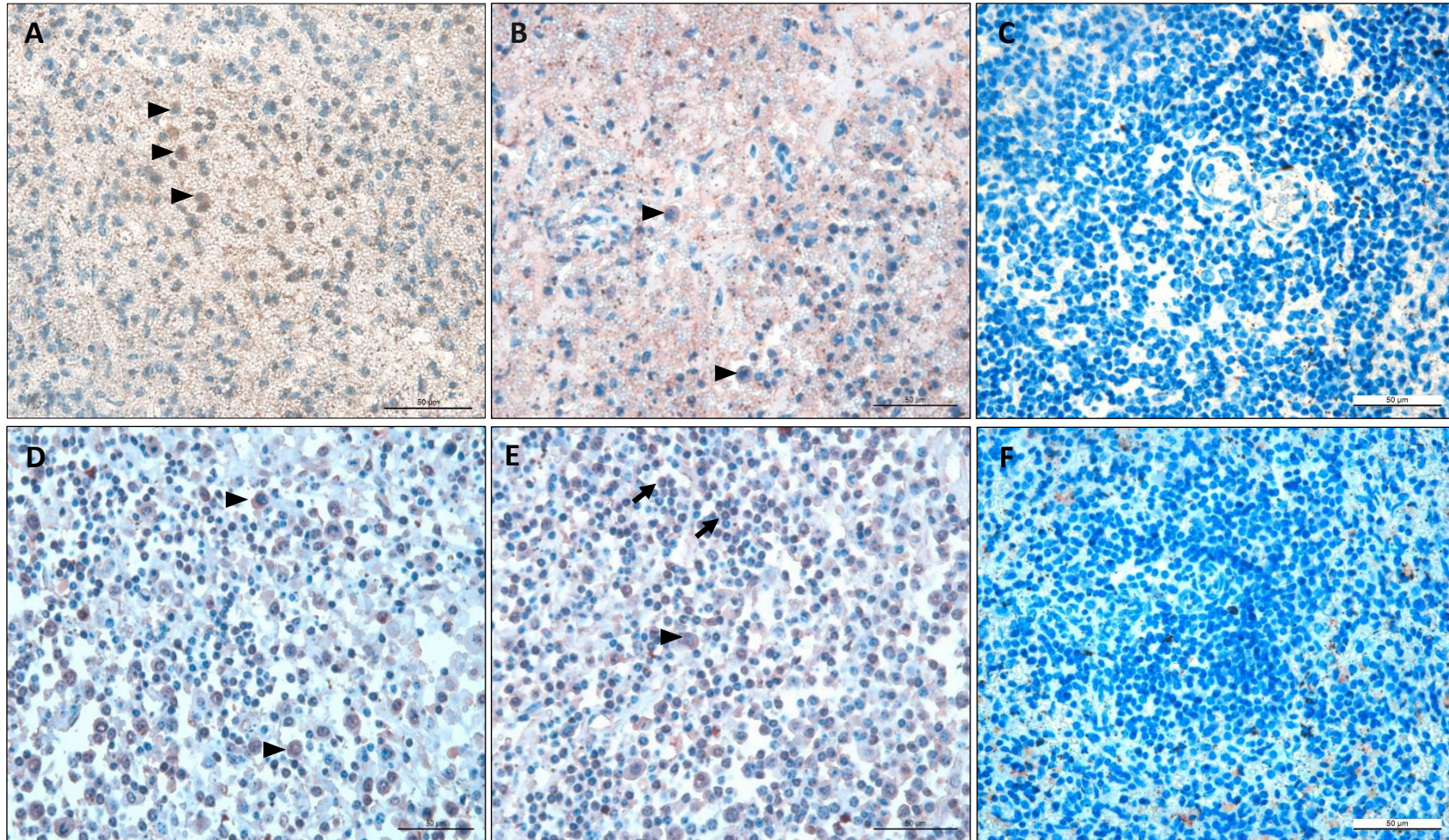


Figura 18: Imuno-histoquímica para o vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) em cervídeos que vieram ao óbito por hemorragia sistêmica, em 2017. A: baço. Marcações em alguns macrófagos (cabeça da seta). IHQ. (400x). B: baço. Intensa hemorragia na polpa vermelha em que observa alguns macrófagos infectados com EHDV (cabeça da seta). IHQ. (400x). C: baço. Controle negativo utilizando soro de coelho (dia zero) soronegativo para EHDV. (400x). D: linfonodo. Na região cortical, macrófago (cabeça da seta) marcado contra o EHDV. IHQ. (400x). E: linfonodo. Vários macrófagos (cabeça da seta) e linfócitos (seta) infectados e marcados na região cortical. IHQ. (400x). F: baço. Animal 2626 negativo para BTV e EHDV.

#### 5.4 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência indireta com proteína G conjugada com o Alexa Fluor 488 foi padronizada com anticorpo primário policlonal de coelho anti-EHDV em célula BHK-21. A melhor marcação foi a diluição de 1:50 do anticorpo primário e 1:500 da proteína G. O controle de células não apresentou marcação (figura 19).

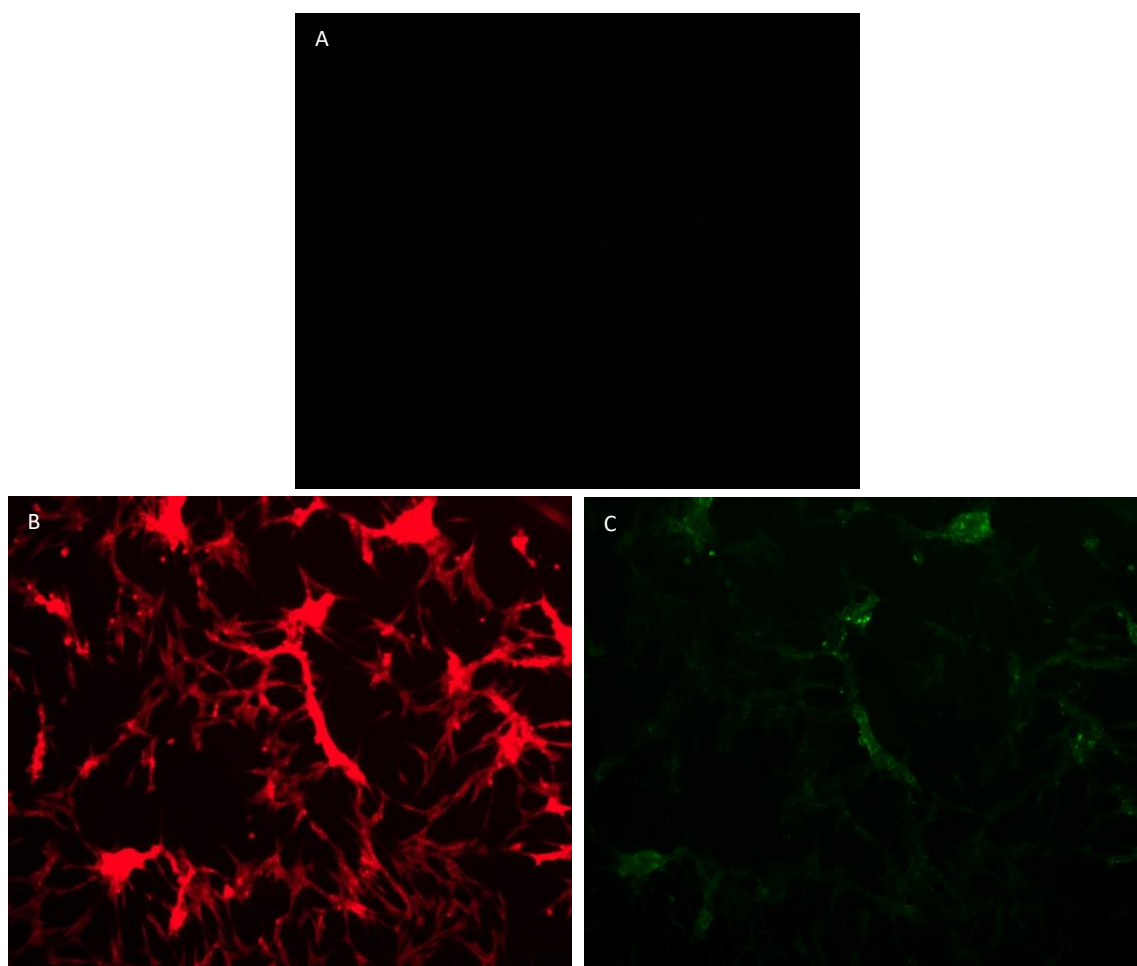


Figura 19: Microscopia de fluorescência (Microscópio Leica DMIL) de cultivo de células BHK-21 infectadas com o vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) com anticorpos conjugados com Alexa Fluor 488. A: Controle negativo de células não infectadas com o vírus no filtro de excitação 480-520nm. (200X). B: Células infectadas no filtro de excitação 515-560nm evidenciando a contra coloração de Azul de Evans. (200X). C: Células infectadas com marcação no citoplasma, no filtro de excitação 480-520nm. (200X).

A a fixação das células foi após 18 horas de infecção do vírus EHDV para ser em seguida testados os dois métodos de imunofluorescência. As dezoito horas de infecção é o tempo necessário em que o vírus replica e produz série de partículas virais imaturas e maduras antes de saírem das células e que possam ser identificadas (Mellor et al., 2009).

O método de imunofluorescência (IF) utilizando os fluorofuros convencionais, apresentam a desvantagem de terem curta duração de emissão da fluorescência (Wilson et al., 2015), assim como visualizado neste estudo, em questão de poucos segundos o brilho das marcações diminuíam. Assim, os pontos quânticos semicondutores (QDs) podem melhorar a IF por apresentarem alto brilho, emissão de espectro estreito e estabilidade a longo prazo (Mansur, 2010; Mansur, 2013).

Na imunofluorescência direta (IFD) foram utilizados anticorpos de coelhos anti-EHDV bioconjugados com pontos quânticos (QDs): ZAIS (core-shell AgInS<sub>2</sub>-ZnS) e CdS (core-shell CdS-ZnS). A IFD foi realizada em células VERO infectadas.

A bioconjugação dos QDs com os anticorpos foi realizada seguindo os protocolos de Hermanson (2008). Durante o procedimento de conjugação os fatores de diluição dos anticorpos, agitação magnética das soluções e alteração do pH podem ter contribuído para desnaturação dos anticorpos. Assim, ao final da conjugação dos 1,5 mL do anticorpo purificado com 3 mg/mL de proteína obteve-se 7,5 mL para cada um dos QDs, ou seja, uma diluição de 10x do volume inicial, com uma concentração de proteínas de 0,15 mg/mL e redução da metade da concentração proteica e consequentemente dos anticorpos.

Na padronização, ambos anticorpos anti-EHDV-2 conjugados com ZAIS E CdS, somente apresentaram marcação quando adicionados sem diluição (puro). Os controles de células e de QDs não conjugados não exibiram imunomarcações (Figuras 20 e 21).

O CdS-ZnS apresenta uma excitação em 440 nm e a emissão que varia de 480 a 900 nm (Liu et al., 2014), enquanto o AgInS<sub>2</sub> é excitado no comprimento de onda de 365 nm e uma emissão variando de 535 a 607 nm (Tang et al., 2011). Assim, ambos podem ter emissão variando da cor verde ao vermelho. Neste estudo, ambos apresentaram emissão

na cor verde, contudo os resultados de ZAIS ( $\text{AgInS}_2$ ) apresentaram uma quantidade maior de marcações e mais brilho nas células infectadas do que o CdS ( $\text{CdS-ZnS}$ ).

Estudos por Mansur et al. (2017), têm evidenciado a eficácia dos anticorpos conjugados com QDs ZAIS ( $\text{AgInS}_2$ ) como método fácil e ecológico. Além disso, os resultados demonstraram que eram preliminarmente citocompatíveis em relação aos QDs CdS e emitiam uma fotoluminescência verde intracelular apropriada. Portanto, esse bioconjugado oferece uma promissora nanoplataforma para aplicações biomédicas e em diagnósticos, além de apresentarem uma fotoluminescência semelhante aos QDs CdS e CdSe que são mais citotóxicos (Oh et al., 2016).

Assim, como em outros estudos de imunofluorescência utilizando fluorofuros convencionais para o BTV (Blacksell & Lunt, 1993; Anjaneya et al., 2018), as marcações com os anticorpos conjugados com ZAIS e CdS também foram observadas no interior dos citoplasmas das células infectadas. Foram visualizados marcações fortes intracitoplasmáticas, principalmente em corpos de inclusão viral que é uma característica da infecção e replicação de BTV em cultura de células (Fu et al., 1999).

A marcações observadas na IFD utilizando os QDs ZAIS e CdS apresentaram características semelhantes às observadas na IFI utilizando fluoróforos convencionais em estudos anteriores. Assim, esse tipo de marcação com QDs pode ser usada como ferramenta para diagnóstico em cultivo celular e ainda pode ser desenvolvido estudos posteriores para identificação do EHDV em tecidos de cervídeos com suspeita de estarem em DHE.

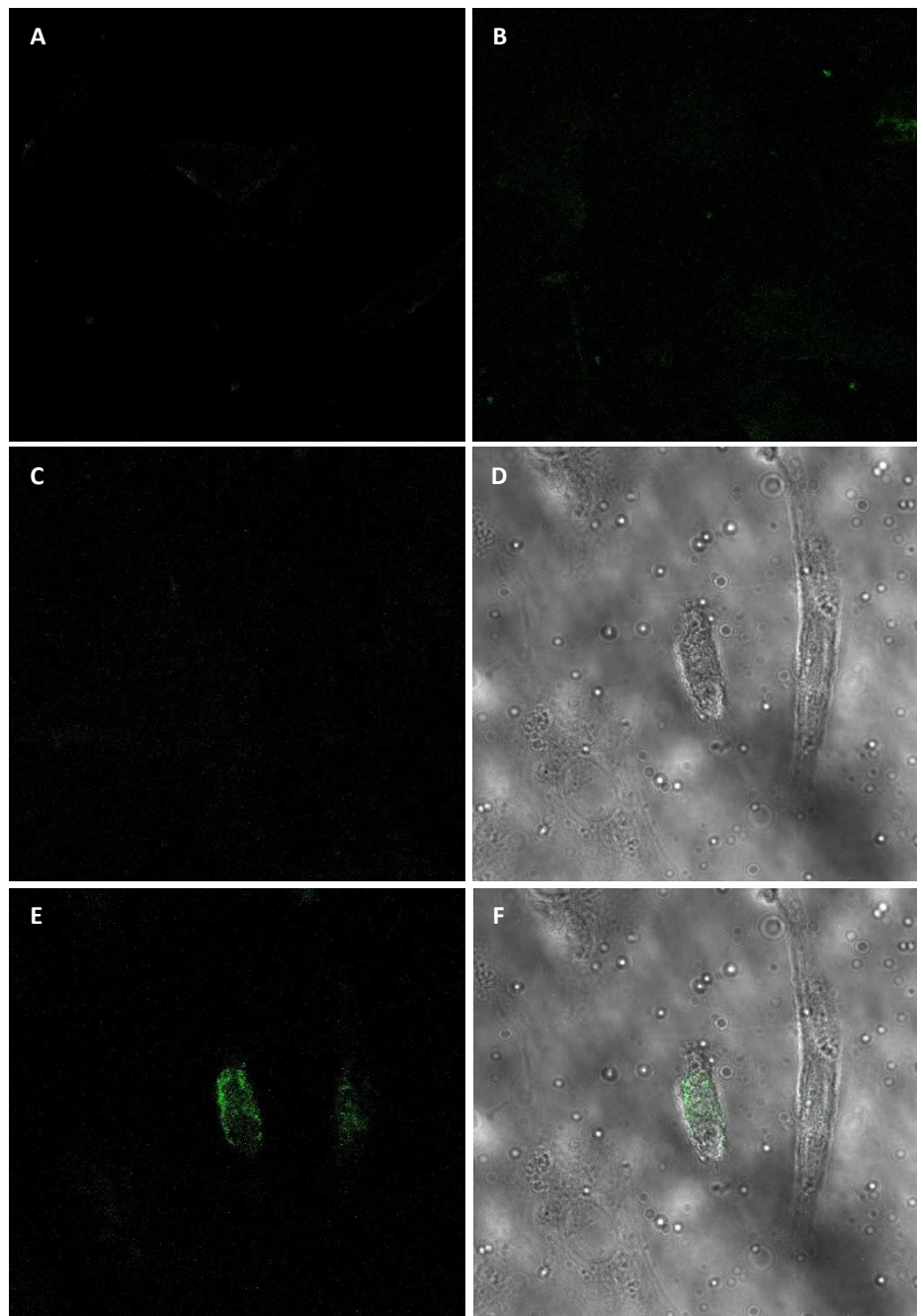


Figura 20: Microscopia pelo Eclipse Ti microscópico confocal (Nikon Instruments, EUA) do cultivo de células VERO infectadas por 18 horas com o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) utilizando anti-EHDV-2 bioconjugados com pontos quânticos CdS (core-shell CdS-ZnS). A: Controle de células não infectadas com o vírus adicionando o CdS sem está conjugado com anticorpo na fluorescência verde (630x). B: Controle de células infectadas com o vírus adicionando o CdS sem está conjugado com anticorpo na fluorescência verde (630x). C: Controle de células não infectadas com o vírus adicionando o anticorpo anti-EHDV-2 conjugado com CdS na fluorescência verde (630x). D: Células infectadas com EHDV sem fluorescência (transmitida)

(630x). E: Células infectadas com EHDV e marcadas com o anticorpo anti-EHDV-2 conjugado com CdS (630x). F: Sobreposição imagens D e E.

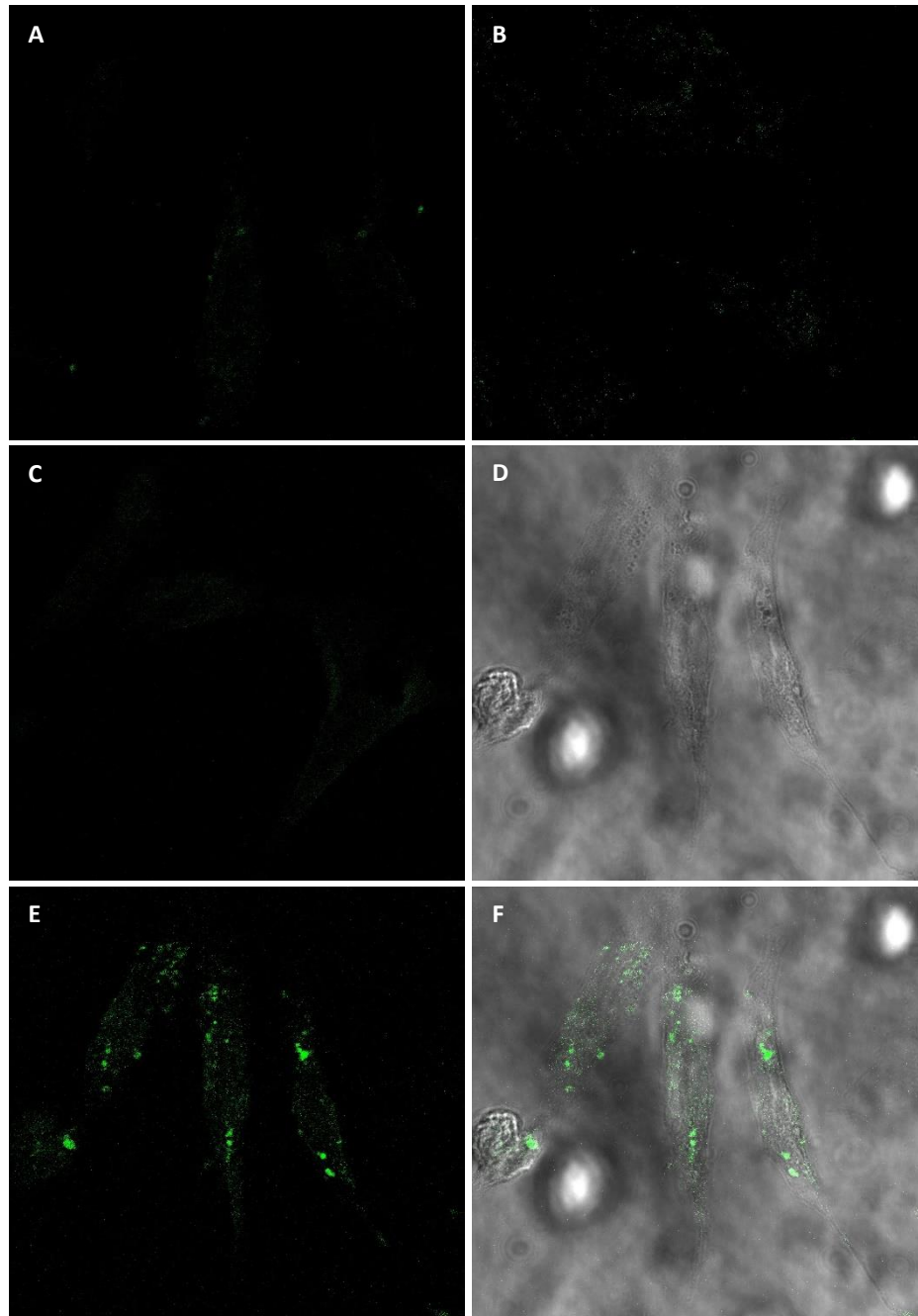


Figura 21: Microscopia pelo Eclipse Ti microscópico confocal (Nikon Instruments, EUA) do cultivo de células VERO infectadas por 18 horas com o vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) utilizando anti-EHDV bioconjugados com pontos quânticos ZAIS (core-shell AgInS<sub>2</sub>-ZnS). A: Controle de células não infectadas com o vírus adicionando o ZAIS sem estar conjugado

com anticorpo na fluorescência verde(630x). B: Controle de células infectadas com o vírus adicionando o ZAIS sem está conjugado com anticorpo na fluorescência verde (630x). C: Controle de células não infectadas com o vírus adicionando o anticorpo anti-EHDV conjugado com ZAIS na fluorescência verde (630x). D: Células infectadas com EHDV sem fluorescência (transmitida) (630x). E: Células infectadas com EHDV e marcadas com o anticorpo anti-EHDV conjugado com ZAIS (630x). F: Sobreposição imagens D e E.

## 5.5 Extração de material genético em tecido parafinado

A extração de RNA em tecidos parafinizados de cervídeos positivos para EHDV apresentou valores limiares de ciclo (Ct) acima de 32 em relação ao órgão extraído fresco que tiveram Ct abaixo de 30. Os dois métodos apresentaram muitos resultados acima do ponto de corte (Ct de 35) que é considerado como positivo no diagnóstico da doença quando o material genético é extraído de imediato.

Várias amostras de tecidos são coletadas de animais com o intuito de diagnosticar doenças infecciosas, sendo os fragmentos desses materiais fixados em formol, incluídos em parafina e armazenados nos laboratórios. Esses espécimes são importantes fontes de material biológico para pesquisa em estudos retrospectivos, que possibilitem a investigação da etiologia e a epidemiologia das patologias que não tinham sido identificadas (Yang et al., 2006; Simonato et al., 2007).

O desenvolvimento de métodos de extração de material genético em tecidos parafinados contribui para diagnóstico definitivo de agentes. A extração de RNA de amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) é problemática, pois o material genético é mínimo e degrada-se durante o processo de fixação do tecido pela formalina (Yang et al., 2006).

A técnica de PCR é a mais utilizada para identificar e amplificar o material genético em amostras FFPE. No entanto, os resultados satisfatórios da reação dependerão da qualidade do DNA ou RNA, que são influenciados pelo período de tempo em que a amostra está fixada, método de extração e tamanho do *amplicon* para o PCR (Dedhia et al., 2007).

As amostras dos animais ZOO-0693 e NEC 2630 ficaram fixadas por dois meses e meio, enquanto os dos outros animais por um mês. Assim, o tempo de fixação na

formalina, pode ter afetado os resultados obtidos. Mckinney et al. (2009) demonstraram que se consegue extrair material genético a partir de tecidos fixados no formol por um período de um mês. Estes autores salientaram que o processo de fixação degrada o RNA, além de adicionar metilol (- CH<sub>2</sub>OH) aos nucleotídeos, o que interfere no PCR e que a extração eficiente é inversamente proporcional ao tempo em que amostra permanece no formol. A degradação do RNA pode continuar mesmo quando ele estiver armazenado na parafina, contudo sendo a degradação bem mais lenta do que se o tecido estivesse somente no formol.

O material genético é degradado geralmente à fragmentos de ácidos nucléicos na faixa de 100 pares de bases (pb) pela formalina. Assim, RT-PCR quantitativo em tempo real tem a probabilidade de ser mais eficaz para detecção de RNA degradado pelo formol, já que necessita de um *amplicon* menor que 100pb e apenas pequenas quantidades de molde (Specht 2001 e Cronin 2004; Mckinney et al., 2009).

O presente estudo, a extração pelo método do Trizol® da Invitrogen™ (Califórnia, EUA) e Stanton et al. (2002) apresentou um número menor de tecidos negativos (7/27) do que com relação ao kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (15/27) como observado na Tabela 9. Os dois testes tiveram resultados negativos nas amostras de animal positivo para BTV e no cervídeo negativo para orbivirus.

O método do kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation tem sido usado para extração e detecção, de BTV usando o teste de RT-qPCR em amostras de cervídeos que vieram ao óbito por doença hemorrágica em São Paulo. Contudo, das 42 amostras utilizadas nesse estudo retrospectivo, três foram positivas com Ct abaixo de 37 e quatro apresentaram valores elevados sugerindo uma baixa concentração de vírus. Para confirmar os resultados, os fragmentos amplificados foram sequenciados e os dados revelaram similaridade com outras sequências de BTV (Kawanami et al., 2018).

Como utilizado neste estudo, Stanton et al. (2002) apresentaram sucesso na extração de material genético utilizando a solução tampão digestão (0,5 mg/mL de proteinase K, 20 mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA e SDS 20%) nos tecidos fixados em formol e parafina para cinamose em cães. Estes autores obtiveram resultados positivos em quase todas as amostras, menos duas que foram negativas na IHQ e tinham lesões leves na

avaliação histopatológica. Eles relataram também que tiveram dificuldade na extração, tendo vários blocos negativos, embora contivessem lesões graves na histopatologia.

Tabela 9: Resultados do CT no RT-qPCR das amostras de cervídeos positivos para o vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) pela extração no órgão fresco e parafinizado usando o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation da Ivitrogen e pelo método do Trizol® da Invitrogen™ (Califórnia, EUA) e resultados da imuno-histoquímica com os respectivos graus de marcação de cada tecido.

<b>Identificação do animal</b>	<b>Órgãos</b>	<b>CT no RT-qPCR dos órgãos frescos</b>	<b>CT no RT-qPCR dos órgãos extraídos pelo kit</b>	<b>CT no RT-qPCR dos órgãos extraídos pelo método do Trizol</b>
NEC 2624	Coração	20,26	N	36,47
	Baço	17,80	N	N
	Fígado	22,04	N	N
	Rim	23,43	NR	NR
NEC 2630	Coração	25,60	N	N
	Baço	23,83	N	38,95
	Fígado	26,78	NR	NR
	Pulmão	22,39	N	37,55
NEC2634	Rim	25,80	N	37,47
	Coração	18,46	36,54	39,64
	Baço	21,96	38,51	N
	Fígado	17,12	N	37,49
NEC 2637	Pulmão	23,25	37,46	34,59
	Rim	18,33	N	34,80
	Coração	18,79	N	38,95
	Baço	22,45	39,14	36,72
NEC 2640	Fígado	20,51	N	N
	Pulmão	39,54	35,78	37,40
	Rim	18,48	N	33,94
	Coração	17,83	N	N
NEC 2644	Baço	19,17	35,61	36,72
	Fígado	17,22	36,99	36,46
	Rim	18,59	37,25	32,66
	Baço	29,73	38,61	39,08
NEC 2644	Fígado	27,00	N	37,22
	Pulmão	25,48	38,69	37,40
	Rim	22,71	N	N

NEC: Identificação da necropsia  
 ZOO: Zoológico Roberto Ribas Lange  
 CT: Valor do limiar de ciclo no RT-qPCR

NR: Não realizado  
 N: Negativo/ Sem CT

Neste estudo, as amostras ficaram por quatro horas na solução de digestão composta por proteinase K conforme Stanton et al. (2002), o que se mostrou suficiente para digerir todo o tecido e expor o material genético. Estudos demonstraram que a digestão dos tecidos FFPE com proteinase K auxilia na liberação e exposição do RNA preso na matriz de ácidos nucleicos com as proteínas (Jackson et al., 1990; McKinney et al., 2009). Jackson et al., 1990 verificaram, ainda, que os tecidos com cinco dias na proteinase K apresentavam mais RNA.

Caso consideremos as amostras positivas com valores de Ct de 35 ou menos como recomendado em tecidos processados de imediato, a extração por kit resultaria em 2 positivos (7,4%), enquanto pelo método de trizol seria um pouco maior com 4 positivos (14,8%). Contudo, como o material genético é bastante degradado pelo processo de fixação em formol e pela parafina, como discutido, optou-se por considerar valores de Ct de 38 como positivo e de 39 como suspeitos, assim como no estudo de Kawanami et al., 2018. Dessa forma, no método de extração por trizol teríamos 18 positivos (66,67%), enquanto pelo kit seriam 10 (37,04%) (Tabela 9).

Foi também observado que não existe um padrão e correlação do Ct das amostras processadas ainda frescas em comparação aos valores de Ct dos tecidos parafinizados. Isso é observado na Figura 22, que mostrou, independente da carga viral do material processado imediatamente, a obtenção do RNA no tecido parafinado apresentou valores de Ct variáveis, sendo que os dois métodos de extração apresentaram uma correspondência entre si.

Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo, e índice Kappa dos dois métodos tendo como teste ouro a extração por órgão fresco (Tabela 10). Com base nos dados, o método do Trizol<sup>®</sup> apresentou melhor confiabilidade e sensibilidade do que o kit. Outra desvantagem do kit é o preço, uma vez que ele é sete vezes maior (R\$ 37,38 por amostra) que pelo método do Trizol<sup>®</sup> (R\$ 5,40 por amostra).

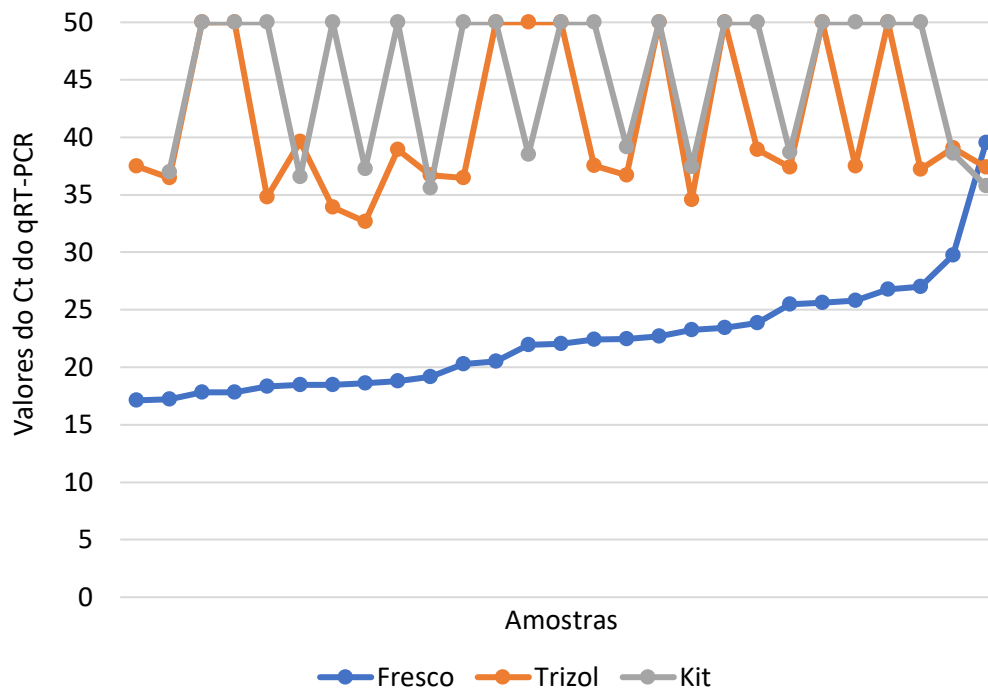


Figura 22: Resultados do CT no RT-qPCR em ordem crescente das amostras de cervídeos positivos para o vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (EHDV) pela extração no órgão fresco e com os respectivos tecidos parafinado extraídos usando o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation da Invitrogen e pelo método do Trizol® da Invitrogen™ (Califórnia, EUA).

Com base na escala do índice kappa, os dois testes apresentaram grau de concordância mediano (Landis & Koch, 1977) com os resultados do RT-qPCR de amostras extraídas frescas. Devido à extração de tecidos FFPE ser problemática e o RNA estar significativamente degradado, seus resultados não tiveram a mesma qualidade do material processado antes de ser fixado (Yang et al., 2006), já que o material fresco sofreu menos com degradação de atividade endógena de RNase. Isso é demonstrado em estudos anteriores como o de McKinney et al. (2009), em que os tecidos FFPE obtiveram em um valor Ct de seis a oito ciclos maior quando comparado com tecidos frescos na detecção de RNA do vírus. Essa diminuição, é resultado da degradação do material genético pelo formol.

Tabela 10: Valores estimados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e índice Kappa para o RT-qPCR de amostras parafinadas extraídas pelo kit e trizol em relação ao órgão fresco.

<b>Testes</b>	<b>Trizol</b>	<b>Kit</b>
Sensibilidade	74,07%	40,74%
Especificidade	100%	100%
Acurácia	80,56%	55,56%
VPP	100%	100%
VPN	56,25%	36%
Kappa	0,355	0,256

## 6 CONCLUSÕES

As lesões histopatológicas são sugestivas de doença hemorrágica epizoótica (EHDV) em amostras de cervídeos, sendo pulmões, baço, fígado e rins os principais órgãos afetados, e comprovam a suscetibilidade de *B. dichotomus* e *M. nana* à infecção.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) utilizando o complexo streptavidina biotina é um método recomendável para diagnóstico de rotina e para estudos retrospectivos da enfermidade.

A imunofluorescência direta utilizando os anticorpos biconjugados com pontos quânticos (QDs) pode ser utilizada para detecção do vírus da DHE em cultivo celular.

A técnica de Trizol® com acetado de amônia foi melhor para extração do material genético do que o protocolo de extração de RNA: kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation.

## REFERÊNCIAS

- AFSHAR, A. Bluetongue: Laboratory diagnosis. *Comparative Immunology, Micro. Infect. Dis.*, v. 17, n. 3-4, p.221-242, 1994.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E. **et al.** Reoviridae. In: FLORES, E. F. (Eds.) *Virologia Veterinária*. 3. ed. Santa Maria: Ufsm, 2017. p. 773-808.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, v. 64, n. 15, p. 5245-50, 2004.
- ANJANEYA, A.; SINGH, K. P.; CHERIAN, S. **et al.** Comparative Neuropathology of Major Indian Bluetongue Virus Serotypes in a Neonatal BALB/c Mouse Model. *J. Comparat. Path.*, v. 162, p. 18–28, 2018.
- ANTHONY, S. J.; MAAN, S.; MAAN, N. **et al.** Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Res.*, v. 145, p. 200–210, 2009.
- ANTONIASSI, N. A. B.; PAVARINI, S. P.; HENZEL, A. **et al.** Aspiration pneumonia associated with oesophageal myonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. *Veterinary Record*, v. 166, p. 52–53, 2010.
- ARITA, G. M. M.; MORATO, R. G.; DUARTE, J. M. B. Língua azul e/ou doença epizoótica hemorrágica. In: DUARTE, J. M. B. *Biologia e Conservação dos Cervídeos Sul Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1997.
- ATTOUI, H.; MOHD JAAFAR, F. Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.34, n.2, p.353-361, 2015.
- ATTOUI, H.; BILLOIR, F.; CANTALOUBE, J. **et al.** Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *Jour. of Virolog. Meth.*, v.89, p.147–158, 2000.
- BALARO, M. F. A.; SANTOS LIMA, M.; DEL FAVA, C. **et al.** Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro. *Brazil. Jour. of Vet. Diag. Invest.*, v. 26, p. 567–570, 2014.
- BALDINI, M. H. M.; ROSA, J. C. C.; MATOS, A. C. D. **et al.** Multiple bluetongue virus serotypes causing death in Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) in Brazil. *Vet. Micro.*, p. 2015–2016, 2018.

BANKFALVI, A.; NAVABI, H.; BIER, B. **et. al.** Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. **J. Pathol.**, v. 174, p. 223-228, 1994.

BARRATT-BOYES, S. M.; ROSSITTO, P. V.; STOTT, J. L. **et. al.** Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. **Jour. Gener. Viro.**, v. 73, n. 8, p. 1953–1960, 1992.

BATTEN, C. A.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BIN-TARIF, A. **et. al.** Bluetongue virus: european community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. **Vet. Micro.**, v.129, p.80-88, 2008.

BELAGANAHALLI, M. N.; MAAN, S.; MAAN, N. S. **et. al.** Full Genome Sequencing of Corriparta Virus, Identifies California Mosquito Pool Virus as a Member of the Corriparta virus Species. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

BERA, D.; QIAN, L.; TSENG, T.K. **et. al.** Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. **Materials**, v.3, p.2260-2245, 2010.

BLACKSELL, S. D.; LUNT, R. A.; NEWBERRY, K. M. Identification of epizootic haemorrhagic disease of deer virus serotypes using a fluorescence inhibition test. **J. Virol. Meth.**, v. 46, n. 2, p. 251–254, 1994.

BLACKSELL, S. D.; LUNT, R. A. Serotype identification of Australian bluetongu viruses using a rapid fluorescence inhibition test. **J. Virol. Meth.**, v. 44, p. 241-250, 1993.

BLOUCH, R.; MCCARTY, A.; MOORE, D. **et. al.** Deer status survey and conservation action plan. Deer specialist group. International Union for Conservation of Nature (IUCN), p.106, 1998.

BORM, P. J. A. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and fibre toxicology**, v.3, n.11, p. 1-35, 2006.

BRADFORD, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976.

BRITO, B. P.; GARDNER, I. A.; HIETALA, S. K. **et. al.** Variation in bluetongue virus real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay results in blood samples of sheep, cattle, and alpaca. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 23, p. 753–756, 2011.

BRUCHEZ, A.; MORONNE, M.J.; GIN, P. **et. al.** Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, v. 281, p. 2013-2016, 1998.

CAMARGO, C. F.; SILVA, P. R. Q. Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular. 2011. 16 f. Revisão de literatura. Universidade Católica de Goiás, Brasília.

CELER JUNIOR, V.; CELER V.; NĚMCOVÁ H. **et. al.** Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. **J. Vet. Med. Seri.**, v. 45, n. 3, p. 183-188, 1998.

CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. Diseases caused by the epizootic hemorrhagic disease virus serogroup. 2016. Disponível em: <[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epizootic\\_hemorrhagic\\_disease.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epizootic_hemorrhagic_disease.pdf)>. Acesso em: 01 jan. 2019.

CĚTRE-SOSSAH, C.; ROGER, M.; SAILLEAU, C. **et. al.** Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: Evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. **Vet. Micro.**, v. 170, n. 3-4, p. 383–390, 2014.

CHAN, W.C.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**, v. 281, 1998.

CHAUVEAU, E.; DOCEUL, V.; LARA, E. **et. al.** Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-i and MDA5 helicases. **Jour. Virol.**, v. 86, n. 21, p. 11789–11799, 2012.

CHERRINGTON J.M.; GHALIB H.W.; SAWYER M.M. **et. al.** Detection of viral antigens in bluetongue virus infected ovine tissues, using the peroxidase-antiperoxidase technique. **American J. Vet. Res.**, v. 46, p. 2356-2359, 1985.

CLAVIJO A.; SUN F.; LESTER T. **et al.** An improved real-time polymerase chain reaction for the simultaneous detection of all serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.22, p.588–593, 2010.

COETZEE, P.; VAN, V. M.; VENTER, E.H. **et al.** A review of experimental infections with bluetongue virus in the mammalian host. **Virus Research**, v.182, p. 21-34, 2014.

CRONIN, M.; PHO, M.; DUTTA, D. **et al.** Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 1, p. 35–42, 2004.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO, J. L. D. **Tratado de Medicina de Animais Selvagens**. 2 ed. São Paulo: ROCA. 2014. 2470p.

DADHICH, H. Bluetongue: an overview of recent trends in diagnostics. **Vet Ital**, v.40, p.564-566, 2004.

DANGLER, C. A.; CONCHA-BERMEJILLO, A.; STOTT, J. L. **et al.** Limitations of in situ hybridization for the detection of bluetongue virus in blood mononuclear cells. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 303–307, 1990.

DARPEL, K.E.; BATTEN, C.A.; VERONESI, E. **et al.** Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in Northern Europe. **Vet. Rec.** p. 253–261, 2007.

DEDHIA, P.; TARALE, S.; DHONGDE, G. **et al.** Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixedparaffin-embedded tissues. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.**, v. 8, p. 55–59, 2007.

DELLA-PORTA, A. J.; PARSONSON, I. M.; MCPHEE, D. A. Problems in the interpretation of diagnostic tests due to cross reactions between orbiviruses and broad serological responses in animals. **Prog Clin Biol Res.**, v. 178, p. 445–453, 1985.

DRIEMEIER, D.; BRITO, M. F.; TRAVERSO, S. D. **et al.** Outbreak of malignant catarrhal fever in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in Brazil. **Vet. Rec.**, v. 151, p. 271–272, 2002.

DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; PIOVEZAN, U. **et al.** *Blastocerus dichotomus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T2828A22160916.en>> Acessado em: 27 dez. 2019.

DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L. **et al.** *Mazama nana*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T29621A22154379.en>>. Acessado em: 27 dez. 2019.

DUARTE, J. M. B.; BRAGA, F. G.; VOGLIOTTI, A. **et al.** **Plano Nacional para a Conservação dos cervídeos ameaçados de extinção**. Brasília: Icmbio. 2012. 66 p.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molec. Phylog. Evolution**, v. 49, p. 17–22, 2008.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Ed. 1, Jaboticabal: Funep. 1996. 14p.

ESCHBAUMER, M.; WERNIKE, K.; BATTEN, C. A. **et al.** Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: Diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure. **Vet. Micro.**, v. 159, n. 3–4, p. 298–306, 2012.

FAVERO, C. M.; MATOS, A. C. D.; CAMPOS, F. S. **et al.** Epizootic Hemorrhagic Disease in Brocket Deer, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 2, p. 346-348, 2013.

FERRO, A. B. **Imunohistoquímica**. Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal. 2013. 138 p.

FISCHER J. R.; HANSEN, L. P.; TURK, J. R. **et al.** An epizootic of hemorrhagic disease in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Missouri: necropsy findings and population impact. **J. Wild. Dis.**, v. 31, p. 30-36, 1995.

FOSTER, N. M.; LUEDKE, A. J.; PARSONSON, I. M. **et al.** Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus Strains. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 192-195, 1991.

FOX, K. A.; DIAMOND, B.; SUN, F. **et al.** Testicular lesions and antler abnormalities in colorado, usa mule deer (*odocoileus hemionus*): a possible role for epizootic hemorrhagic disease virus. **J. Wild. Dis.**, v. 51, n. 1, p. 166–176, 2015.

FU, H.; LEAKE, C.J.; MERTENS, P.P.C. **et al.** The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Arch. Virol.**, v. 144, p. 747–61, 1999.

GARD, G. P.; WEIR, R. P.; WALSH, S. J. Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation methods. **Vet Microbiol.**, v. 18, p. 119–125, 1988.

GASPARINI, M.; NOMIKOU, K; MORECROFT, E. **et al.** Bluetongue virus: detection of BTV-4, BTV-8, BTV-10 and BTV-16 in semen from asymptomatic bulls in Brazil. **Cur. Opin. Virol.**, v. 14, p. 47–58, 2017.

GAYDOS, J. K.; DAVIDSON, W. R.; ELVINGER, F. **et al.** Innate resistance to epizootic hemorrhagic disease in white-tailed deer. **J. Wildl. Dis.**, v. 38, p. 713-719, 2002.

GIBBS, E.P., LAWMAN, M.J. Infection of British deer and farm animals with epizootic haemorrhagic disease of deer virus. **J. Comp. Pathol.**, v. 87, p. 335–343, 1977.

GIOVANIN, D. **I Relatório Nacional sobre Gestão e Uso Sustentável da Fauna Silvestre**. 1 ed. Brasília: RENCTAS. 2016. 668 p.

GORSCH, C.; VAGNOZZI, A.; DUFFY, S. **et al.** Bluetongue: isolation and characterization of the virus and vector identification in the northeast of Argentina. **Ver. Arg. Microb.**, v. 34, p. 150-156, 2002.

GRIMES, J.M.; BURROUGHS, J. N.; GOUET, P. **et al.** The atomic structure of the bluetongue virus core. **Nature**, v. 395, p. 470–478, 1998.

- GROOCOCK, C. M.; CAMPBELL, C. H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Cana. J. of Comp. Med.**, v. 46, p. 160-164, 1982.
- GUIMARÃES, L. L. B.; ROSA, J. C. C.; MATOS, A. C. D. **et al.** Identification of bluetongue virus serotypes 1, 4, and 17 co-infections in sheep flocks during outbreaks in Brazil. **Res.Vet. Scie.**, v. 113, p. 87-93, 2017.
- GUTIÉRREZ, E. E.; HELGEN, K. M.; MCDONOUGH, M. M. **et al.** A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys**, v. 697, p. 87-131, 2017.
- HASSAN, S. S.; ROY, P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. **J. Virol.**, v. 73, n. 12, p. 9832-9842, 1999.
- HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**, 3 ed; Elsevier Inc: Amsterdam, 2008. 1200 p.
- HOWERTH, E. W. Cytokine release and endotelial dysfunction: a perfect storm in orbivirus pathogenesis. **Vet. Ital. J. Impact**,v. 51, n.4, p. 275-281, 2015.
- HUTCHEON, D. Malarial catarrhal fever of sheep. **Vet.y Record**, v. 14, p. 629-633, 1902.
- ICTV International Committee on Taxonomy of viruses, Orbivirus. 2012. Disponível em:<<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acessado em: 07 de jan. de 2019.
- IMAM, S. A.; YOUNG, L.; CHAIWUN, B.; TAYLOR, C. R. Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. **Anticancer Res.**, v. 15, p.1153-1158, 1995.
- ITAIPU. Reservas e refúgios. 2010. Disponível em: <<https://www.itaipu.gov.br/print/280>>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018. Disponível em:<[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado em: 05 de jan. de 2019.
- JACKSON, D. P.; LEWIS, F.A.; TAYLOR, G.R. **et al.** Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 499–504, 1990.
- JENCKEL, M.; BRÉARD, E.; SCHULZ, C. **et al.** Complete Coding Genome Sequence of Putative Novel Bluetongue Virus Serotype 27. **Gen. Announc.**, v. 3, n 2, 2015.

JENNINGS, M.; BOORMAN, J. Use of the indirect fluorescent antibody technique for the detection of bluetongue virus antigen in tissue smears from *Culicoides variipennis* (diptera, ceratopogonidae). **Vet. Micro.**, v. 5, n. 1, p. 13–18, 1980.

KAWAI, A.; SERIZAWA, A.; TSUTSUMI, Y. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. **Pathol. Int.**, v. 44, p. 759-764, 1994.

KAWANAMI, A. E. **Vírus da língua azul em cervídeos neotropicais e bovídeos domésticos**. 2016. 99 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual, São Paulo, Jaboticabal.

KAWANAMI, A. E.; OLIVEIRA, J. P.; ARENALES, A. **et al.** Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. **Pesq.Vet. Bra.**, v. 38, n. 6, p. 137-142, 2012.

KIM, S. H.; KOOK, M. C.; SHIN, Y. K. **et al.** Evaluation of Antigen Retrieval Buffer Systems. **J. Mol. Hist.**, v. 35, n.4, p. 409–416, 2003.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agrément for categorical data. **Biometrics**, v.33, p.159-174, 1977.

LEE, F.; CHEN, J. L.; LIN, C. M. **et al.** Presence of bluetongue virus in the marginal zone of the spleen in acute infected sheep. **Vet. Micro.**, v. 152, n. 1-2, p. 96–100, 2011.

LEE, H.; WEBB-LOWE, R.; JOHNSON, T. J. **et al.** Photoluminescence study of in situ annealed InAs quantum dots: Doublepeak emission associated with bimodal size distribution. **Appl. Phys. Lett.**, v. 73, n. 24, p. 3556, 1998.

LEGISA, D.; GONZALEZ, F.; STEFANO, G. **et al.** Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. **J. Gener. Virol.**, v. 94, p. 652-662, 2013.

LIU, L.; HU, S.; PAN, Y. **et al.** Optimizing the synthesis of CdS/ZnS core/shell semiconductor nanocrystals for bioimaging applications. **Beilstein J. Nanot.**, v. 5, p. 919–926, 2014.

LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C.; MATOS, A. C. D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. **Vet. Ital. J. Impact**, v.51, p. 253–262, 2015.

LOPEZ, E.; FIGUEROA, S.; OSET-GASQUE, M. J. **et al.** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. **Br. J. Pharmacol.**, v. 138, p. 901-911, 2003.

LÓPEZ-OLVERA, J.R.; FALCONI, C.; FERNÁNDEZ-PACHECO, P. **et al.** Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8. **Vet. Micro.**, v.145, p. 148–152, 2010.

LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the armed force institute of pathology**. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968. 258p.

KAMOMAE, Y.; KAMOMAE, M.; OHTA, Y. **et al.** Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 infection in cattle, Japan, 2015. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 24, n. 5, p. 902–905, 2018.

KEDMI, M.; VAN STRATEN, M.; EZRA, E. **et al.** Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. **J. Dairy Sci.**, v. 93, p. 2486–2495, 2010.

RATINIER, M.; CAPORALE, M.; GOLDBERGER, M. **et al.** Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. **PLoS Pathog**, v. 7, 2011.

MAAN, N. S.; MAAN, S.; POTGIETER A. C. **et al.** Development of Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. **Transb. Emerg. Dis.**, v. 64, n. 4 p. 1120-1132, 2016.

MAAN, N. S.; MAAN, S.; BELAGANAHALLI, M. **et al.** A quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) assay to detect genome segment 9 of all 26 bluetongue virus serotypes. **J Virol Methods**, v. 213, p. 118-126, 2014.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; ROSS-SMITH. **et al.** Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. **Virology**, v. 377, p. 308–318, 2008.

MAAN, S.; RAO, S.; MAAN, N. S. **et al.** Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. **J. Virol. Meth.**, v. 143, n. 2, p. 132–139, 2007.

MACLACHLAN, N. J.; ZIENTARA, S.; WILSON, W. C. **et al.** Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses: recent developments with these globally re-emerging arboviral infections of ruminants. **Cur. Opin. Virol.**, v. 34, p. 56–62, 2019.

MACLACHLAN, N. J.; ZIENTARA, S.; SAVINI, G. **et al.** Epizootic haemorrhagic disease. **Revue Sci. Tech.**, v.2, n.34, p. 341-351, 2015.

MACLACHLAN, N. J.; JAGELS, G.; ROSSITTO, P. V. **et al.** The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. **Vet. Path.**, v. 27, n. 4, p. 223–229, 1990.

MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S.; CARVALHO, S. M. **et al.** One-Pot Aqueous Synthesis of Fluorescent Ag-In-Zn-S Quantum Dot/Polymer Bioconjugates for Multiplex Optical Bioimaging of Glioblastoma Cells. **Contrast Media & Mol. Imag.**, p. 1-15, 2017.

MANSUR, A. A. P.; MANSUR, F. S.; SORIANO-ARAÚJO, A. **et al.** Fluorescent nanohybrids based on quantum dot–chitosan–antibody as potential cancer biomarkers. **Acs. Applied Mater. Interfaces.**, v. 6, n. 14, p. 11403–11412, 2014.

MANSUR, A. A. P.; SALIBA, J. B.; MANSUR, H. S. Surface Modified Fluorescent Quantum Dots with Neurotransmitter Ligands for Potential Targeting of Cell Signaling Applications. **Colloids and Surfaces**, v. 111, p.60-70, 2013.

MANSUR, H. S. Quantum Dots and Nanocomposites. **WIREs Nanomedicine Nanobiotechnol.** v. 2, p.113–129, 2010.

MARÍN-LÓPEZ, A.; BERMÚDEZ, R.; CALVO-PINILLA, E. **et al.** Pathological Characterization of IFNAR (-/-) Mice Infected With Bluetongue Virus Serotype 4. **International J.Biol. Sci.**, v. 12, n. 12, p. 1448–1460, 2016.

MARSH, J.N.; PARTLOW, K. C.; ABENDSCHEIN, D. R. **et al.** Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 33, n. 6, p. 950-958, 2007.

MARTINS, T. M.; MINIZ, C. S.; PAIXÃO, J. R. M. **et al.** Endometrial transcription of microbial molecular patterns receptors in Gyr and F1 Holstein x Gyr postpartum cows. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 69, n.4, p. 835-842, 2017.

MATOS, A. C. D.; ROSA, J. C. C.; NOMIKOU, K. **et al.** Genome sequence of Bluetongue virus serotype 17 isolated in Brazil in 2014. **Genome Announcements**, v. 4, 2016.

MATOS, A. C. D.; LONGO, B. C.; PINHEIRO, M. A. **et al.** XXXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA, 2018, Gramado. Epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus co-circulation and co-infection in deer of captivity in Brazil, 2018.

MCKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **J. Immunol. Meth.**, v. 96, n. 2, p. 271–278, 1987.

MCKINNEY, M. D.; MOON, S. J.; KULESH, D. A. **et al.** Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. **J. Clin. Virol.**, v. 44, n. 1, p. 39–42, 2009.

MECHAM, J. O.; BROWN, P. L.; MCHOLLAND, L. E. In situ immune infrared fluorescent staining for detection and quantitation of bluetongue virus in *Culicoides* insect cell culture. **J. Virol. Meth.**, v. 158, n.1-2, p. 110–113, 2009.

MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. **Bluetongue: Biology of animal infections**. Ed. 1, London: Elsevier. 2009. 527p.

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

MERTENS, P. P. C.; ATTOUI, H.; DUNCAN, R. **et al.** Reoviridae. In: FAUQUET, M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.(Ed.) **Virus Taxonomy**: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C. Ball. London: Elsevier/Academic Press, 2005, p.447-454.

MERTENS, P. P. C.; BURROUGHS, J. N.; ANDERSON, J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. **Virology**, v. 157, n. 2, p. 375–386, 1987.

MILLER, R. S.; FARNSWORTH, M. L.; MALMBERG, J. L. Diseases at the livestock–wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States. **Prev. Vet. Med.**, v. 110, n. 2, p. 119–132, 2013.

MILLER, R.T.; ESTRAN, C. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker–suggestions for optimal use. **Appl. Immunohistochem.**, v. 3, p. 190-193, 1995.

MILLS, M. K.; RUDER, M. G.; NAYDUCH, D. **et. al.** Dynamics of epizootic hemorrhagic disease virus infection within the vector, *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 1-15, 2017.

MONIWA, M.; EMBURY-HYATT, C.; ZHANG, Z. **et al.** Experimental foot-and-mouth disease virus infection in white tailed deer. **J. Compar. Path.**, v. 147, n. 2, p. 330-342, 2012.

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.

MOURA, A. C.; LAZZARI, V. M.; AGNES, G. **et al.** Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control? **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n.3, p. 336–341, 2014.

NAVAS-SUÁREZ, P. E.; DÍAZ-DELGADO, J.; MATUSHIMA, E. R. **et. al.** A retrospective pathology study of two neotropical deer species (1995-2015), Brazil: Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) and brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **PLOS ONE**, v.13, n.6, 2018.

OH, E.; LIU, R.; NEL, A. **et al.** Meta-analysis of cellular toxicity for cadmium-containing quantum dots. **Nat. Nanotech.**, v. 11, n. 5, p. 479–486, 2016.

OIE – World Organisation for Animal Health. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>>. Acessado em: 07 jan. 2019.

OIE. Bluetongue. Terrestrial Animal Health Code. Paris, France. 25th Edition, 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/>>. Acessado em: 26 dez. 2018.

OIE. Epizootic haemorrhagic disease. Technical Disease Cards. 2009. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/EPIZOOTIC\\_HEAMORRHAGIC\\_DISEASE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/EPIZOOTIC_HEAMORRHAGIC_DISEASE.pdf)>. Acessado em: 12 mar. 2019.

ORRÙ, G.; FERRANDO, M. L.; MELONI, M. **et. al.** Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. **J. Virol. Meth.**, v. 137, n. 1, p. 34–42, 2006.

OSTLUND, E. N. Veterinary Services, Orbivirus Activities at NVSL. U.S. Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services Science, Technology and Analysis Service, 2015. Disponível em: <<http://www.usaha.org/Portals/6/2015%20%20BTV%20EHDV%20AHSV%20Ostlund.pdf>> Acesso: 18 out.2016.

PANDOLFI, J. R. C. **Língua Azul e Doença Epizootica Hemorrágica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres.** 1999. 68 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – patologia veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

PARSONSON, I. M.; MCCOLL, K. A. Retrospective diagnosis of bluetongue virus in stored frozen and fixed tissue samples using PCR. **Vet. Microb.**, v. 46, p.143-149, 1995.

PENG, X.; YU, W. W.; QU, L. **et. al.** Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chem. Mater.**, v. 15, p. 2854-2860, 2003.

PINDER, L. Marsh deer seasonal movements and home range size. In: PINDER, L.; SEAL, U. S. (Eds.) **Cervo-do-pantanal *Blastocerus dichotomus* análise da**

**Viabilidade de População e Habitat (PHVA).** Apple Valley: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. 1995. p.121-127.

PRESTWOOD, A.K.T.; KISTNER, T.P.; KELLOGG, F.E. **et. al.** The 1971 outbreak of hemorrhagic disease among white-tailed deer of the southeastern United States. **J. Wildl. Dis.**, v. 10, p. 2217-224, 1974.

PUGGIONI, G.; PINTUS, D.; MELZI, E. **et. al.** Testicular degeneration and infertility following arbovirus infection. **J. Virol.**, v. 92, n. 19, p. 1-17, 2018.

QUIST, C. F.; HOWERTH, E. W.; STALLKNECHT D.E. **et. al.** Host defense response associated with experimental hemorrhagic disease in white-tailed deer. **J. Wildl. Dis.**, v. 33, n. 3 p. 584-599, 1997.

RAIZMAN, E. A.; POGRANICHNIY, R.; LEVY, M. **et. al.** Experimental infection of white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*) with bovine viral diarrhea virus type-1 isolated from free-ranging white-tailed deer. **Wild. Dis. Association**, v.45, n.3, p.653–660, 2009.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immuno- histochemistry. **Vet. Path.**, v. 42, p. 405-426, 2005.

RATINIER, M.; CAPORALE, M.; GOLDBERGER, M. **et. al.** Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. **PLoS Pathology**, v. 7, n. 12, 2011.

RIKANS, L. E.; YAMANO, T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 14, p. 110-117, 2000.

ROY, P.; BOYCE, M.; NOAD, R. Prospects for improved bluetongue vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 120–128, 2009.

RUDER, M. G.; STALLKNECHT, D. E.; ALLISON, A. B. **et. al.** Host and potential vector susceptibility to an emerging orbivirus in the United States. **Vet. Path.**, v. 53, n. 3, p. 574–584, 2015.

RUSSELL, G. C.; STEWART, J. P.; HAIG, D. M. Malignant catarrhal fever: A review. **The Vet. Journal**, v. 179, n. 3, p. 324–335, 2009.

SAILLEAU, C.; ZANELLA, G.; BREARD, E. **et. al.** Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. **Vet. Microb.**, v. 155, n. 2-4, p. 191–197, 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 3.ed. 2001. p.1124-1125.

SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ B.; RISALDE M. A. **et al.** Immunohistochemical Detection of Bluetongue Virus in Fixed Tissue. **J. Comp. Path.**, v. 143, n. 1, p. 20-28, 2010.

SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 243p.

SCHATKOSKI, V. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas Semicondutoras com Estrutura tipo “Núcleo/Casca” CdxMn1-xS/CdSe Obtidas por Rota Coloidal Aquosa.** 2001. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

SCHROEDER M. E.; JOHNSON D. J.; OSTLUND E. N. **et al.** Development and performance evaluation of a bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 25, p. 709–719, 2013.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.P.; CONTRERAS, V.; **et al.** Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res*, v. 39, n.5, p. 39-46, 2008.

SCOTT, J. B.; BARDSLEY, K. D.; DIEM, K. **et al.** Epizootic hemorrhagic disease: analysis of tissues by amplification and in situ hybridization reveals widespread orbivirus infection at low copy numbers. **J. Virol.**, v. 72, n. 5, p. 3863-3871, 1998.

SHARMA, P.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W. Epizootic haemorrhagic disease virus induced apoptosis in bovine carotid artery endothelium is p53 independent. **Vet Ital.**, v. 52, n.3-4, p. 363-368, 2016.

SHIRAFUJI, H.; KATO, T.; YAMAKAWA, M. **et al.** Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985–2013: Identification of their serotypes and geographical genetic types. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 38–46, 2017.

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

SIMBERG, D.; DUZA, T.; PARK, J. H. **et al.** Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 104, n. 3, p. 932-936, 2007.

SIMONATO, L. E.; GARCIA, J. F.; Nunes, C. M. **et al.** Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 2, 2007.

STALLKNECHT D. E.; HOWERTH E. W. Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: Surveillance methods. **Vet. Ital.**, v. 40, n.3, p. 203–207, 2004.

STANTON, J. B.; POET S.; FRASCA S. **et al.** Development of a semi-nested reverse transcription polymerase chain reaction assay for the retrospective diagnosis of canine distemper virus infection. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 14, n.1, p. 47-52, 2002.

STEVENS, G.; MCCLUSKEY, B.; KING, A. **et al.** Review of the 2012 epizootic hemorrhagic disease outbreak in domestic ruminants in the United States. **PLoS One.**, v. 10, n. 8, p. 1-11, 2015.

STOTT, J. L.; BARBER, T. L.; OSBURN, B. I. Immunological response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. **American J. Vet. Research**, v. 46, n. 5, p.1043-1049, 1985.

SZABOÂ, M. P.; CASTRO, M.B.; RAMOS, H. G. C. **et al.** Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Vet. Parasit.**, v. 143, n. 2, p.147-154, 2007.

SZENT-GYORGYI, C.; SCHMIDT, B. F.; CREEGER, Y. **et al.** Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. **Nature biotechnology**, v.26, p.235-240, 2008.

TANG, X.; YU, K.; XU, Q. **et al.** Synthesis and characterization of AgInS<sub>2</sub>-ZnS heterodimers with tunable photoluminescence. **J. Mater. Chem.**, v.21, p. 11239–11243, 2011.

TARABLA H. D. **Epidemiología Diagnóstica**. 1 ed. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral. 2000. 122 p.

TOMA, H. E. **A nanotecnologia das moléculas**, Química Nova na Escola, v. 21. p. 3-9, 2005.

TORIMOTO, T.; ADACHI, T.; OKAZAKI, K. **et al.** Facile synthesis of ZnS-AgInS<sub>2</sub> solid solution nanoparticles for a color-adjustable luminophore. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n.41, p. 12388–12389, 2007.

TOUSSAINT, J. F.; SAILEAU, C.; BREARD, E. **et al.** Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. **J. Virol. Meth.**, v.140, p.115– 123, 2007.

TSAI, K.; KARSTAD, L. The pathogenesis of epizootic hemorrhagic disease of deer: an electron microscopic study. **Am J Pathol.** v.70, p. 379–400, 1973.

- UCHINUNO, Y.; ITO, T.; GOTO, Y. **et al.** Differences in Ibaraki virus RNA segment 3 sequences from three epidemics. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, p. 1257–1263, 2003.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F. **et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7, 2002.
- VERDEZOTO, J.; BREARD, E.; VIAROUGE, C. **et al.** Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. **Transb. Emerg. Dis.**, v. 65, n. 1, p. 244–247, 2017.
- VIAROUGE, C.; LANCELOT, R.; RIVES, G. **et al.** Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. **Vet. Microb.**, v. 174, n. 1-2, p. 78–85, 2014.
- WEIR, R. P.; HARMSSEN, M. B.; HUNT, N. T. **et al.** EHDV-1, a new Australian serotype of epizootic haemorrhagic disease virus isolated from sentinel cattle in the Northern Territory. **Vet. Microb.**, v. 58, n. 2-4, p. 135–143, 1997.
- WILLIAMSON, S.; WOODGER, N.; DARPEL, K. Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. **In Practice**, v. 30, n. 5, p. 242–251, 2008.
- WILSON, W. C.; DANIELS, P.; OSTLUND, D. E. **et al.** Diagnostic Tools for Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease Viruses Applicable to North American Veterinary Diagnosticians. **Vector-borne And Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 6, p.364-373, 2015.
- WILSON, W. C.; HINDSON, B. J.; O'HEARN ES, H. S. **et al.** A multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 21, p.760–770, 2009.
- WILSON, W. C.; STALLKNECHT, D. E.; MECHAM, J. O. Field-deployable real-time polymerase chain reaction detection of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viral ribonucleic acid. **Vet Ital**, v. 40, p.587–593, 2004.
- YANG, W.; MAQSODI, B.; MA, Y. **et al.** Direct quantification of gene expression in homogenates of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Biotechniques**, v. 40, n. 4, p.481-486, 2006.
- ZULIANI, A.; MASSOLO, A.; LYSYK, T. **et al.** Modelling the northward expansion of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) under future climate scenarios. **PLoS One.**, v. 10, n.8, p. 1-23, 2015.

**ANEXO A - Certificado de aprovação do projeto da produção do soro hiperimune, expedido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal de Minas Gerais.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Produção de soro hiperimune para utilização em testes de diagnóstico de doenças infecciosas virais dos animais", protocolo do CEUA: 263/2017 sob a responsabilidade de Zelia Ines Portela Lobato que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 01/11/2017.

Vigência da Autorização	30/10/2017 a 08/10/2021
Finalidade	Extensão
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	2kg / 45(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Experimental Prof Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária, UFMG
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	2kg / 45(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Experimental Prof Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária, UFMG
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	2kg / 45(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Experimental Prof Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária, UFMG
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	2kg / 45(dias)
Sexo	indiferente

Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, Escola de Veterinária, UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	2kg / 45(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, Escola de Veterinária, UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	2kg / 45(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa

Considerações posteriores:

01/11/2017	Aprovado na reunião do dia 30/10/2017. Validade: 30/10/2017 à 08/10/2021
------------	--

Belo Horizonte, 23/01/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

**ANEXO B - Certificado de autorização do processamento e análise dos tecidos de cervídeos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).**



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**

<b>Número:</b> 61638-1	<b>Data da Emissão:</b> 26/02/2018 17:16	<b>Data para Revalidação*:</b> 28/03/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: Mariana Andrioli Pinheiro	CPF: 062.497.483-93
Título do Projeto: Padronização de técnicas de imuno-histoquímica, imunofluorescência e extração do material genético de tecidos formalizados oriundos de cervídeos para diagnóstico do vírus da doença hemorrágica epizootica.	
Nome da Instituição : UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	CNPJ: 17.217.985/0001-04

**Cronograma de atividades**

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Racabimento, análise e processamento dos tecidos formalizados de cervídeos	03/2018	07/2018
2	Imuno-histoquímica, imunofluorescência e RT-qPCR das amostras	07/2018	02/2019
3	Racabimento, análise e processamento dos tecidos formalizados de cervídeos	03/2019	07/2019
4	Imuno-histoquímica, imunofluorescência e RT-qPCR das amostras	07/2019	02/2020

**Observações e ressalvas**

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

**Equipe**

#	Nome	Função	CPF	Déc. Identidade	Nacionalidade
1	Zéila Inês Fortes Iobato	Orientadora	528.123.596-68	M-1312.252 SSP-MG	Brasileira
2	Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes	Coordenadora	956.330.656-20	MG9959168 SSP-MG	Brasileira
3	ZALMER SILVINO CUBAS	Colaborador	519.850.249-87	3.187.774-T IIPFC-PR	Brasileira
4	Ana Carolina Diniz Matos	Coordenadora	083.794.186-54	MG13810064 PCTMG-MG	Brasileira
5	HERMAN SANDER MANSUR	Colaborador	488.045.256-49	1009633 SSP-MG	Brasileira
6	ALEXANDRA ANCELMO PISCITELLI MANSUR	Colaboradora	970.999.536-72	7462170 SSP-MG	Brasileira

**Locais onde as atividades de campo serão executadas**

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

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

**Código de autenticação: 81456539**



Página 1/4



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: 61638-1	Data da Emissão: 26/02/2018 17:16	Data para Revalidação*: 28/03/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Mariana Andrioli Pinheiro	CPF: 062.497.483-93
Título do Projeto: Padronização de técnicas de imuno-histoquímica, imunofluorescência e extração do material genético de tecidos formalizados oriundos de cervídeos para diagnóstico do vírus da doença hemorrágica epizootica.	
Nome da Instituição : UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	CNPJ: 17.217.985/0001-04

1	FOZ DO IGUAÇU	PR	Refugio Biológico de Bela Vista, da Itaipu Binacional	Fora de UC Federal
---	---------------	----	---	--------------------

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Blastococcus dichotomus</i> , <i>Mazama nana</i>

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta(animal que veio a óbito )
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Lacre

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	

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

Código de autenticação: 81456539



Página 2/4

**ANEXO C - Certificado de aprovação do projeto do uso de tecidos de cervídeos para padronização de diagnósticos, expedido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal de Minas Gerais**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Diagnóstico laboratorial do vírus da doença hemorrágica epizootica em cervídeos: Imuno-histoquímica, imunofluorescência e RT-qPCR a partir de tecidos formalizados e parafinados", protocolo do CEUA: 123/2018 sob a responsabilidade de Zelia Ines Portela Lobato que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2018.

Vigência da Autorização	21/05/2018 a 20/05/2023
Finalidade	Pesquisa

Considerações posteriores:

21/05/2018	Aprovado na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023
------------	--

Belo Horizonte, 23/01/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

ANEXO D - Tabela com os dados da ficha clínica e de necropsia dos cervídeos que vieram ao óbito com doença hemorrágica em 2017 na Itaipu Binacional.

Identificação do animal	Espécie	Histórico	Descrição macroscópica	Achados/comentários
NEC 2624	<i>B. dichotomus</i>	Anorexia e infestação de carrapato. Animal encontrado morto no recinto.	<p><b>Exame externo:</b> <u>Pele e mucosas:</u> Alopecia em regiões de pescoço com crostas enegrecidas. Pelagem opaca. Mucosas limpas e sem alterações.</p> <p><b>Exame interno:</b> <u>Cavidade abdominal:</u> Líquido amarelo sanguinolento, hemoperitônio. <u>Sistema digestório:</u> Petéquias hemorrágicas em serosas do rúmen, retículo, omaso, abomasso, duodeno, jejuno e ílio. <u>Estômago:</u> Rúmen repleto de gás, reduzido conteúdo alimentas; Abomasso com hemorragia focal na mucosa. <u>Fígado:</u> bordas finas e congesto. <u>Sistema linfático:</u> <u>Baço:</u> com bordas pálidas e finas, petéquias focais, presença de isquemia. <u>Sistema urogenital:</u> <u>Rim:</u> friável, hemorrágico em cortical, medular e pelve; há distinção entre cortical e medular; superfície dos rins congestas, com aspecto de pontilhado claro e escuro. <u>Vesícula urinária:</u> parede espessada e petéquias.</p> <p><u>Cavidade torácica:</u> Líquido amarelo sanguinolento, vasos ingurgitados. Petéquias hemorrágicas na parede do tórax, sob as costelas e musculatura intercostal.</p>	<p><u>Cavidade abdominal:</u> Líquido sanguinolento; hemoperitônio. <u>Cavidade torácica:</u> Líquido sanguinolento; hemotórax. <u>Estômago:</u> Quatro câmaras, petéquias hemorrágicas na serosa, pouco conteúdo alimentas; distúrbio da coagulação, endoflebite; hemorragia. <u>Pulmão:</u> Congesto, hemorrágicos, hemorragia. <u>Coração:</u> Petéquias hemorrágicas e sufusões, difusas e extensas, superfícies do miocárdio e endocárdio; endoflebite, hemorragia. <u>Baço:</u> Hipocorado; distúrbios da coagulação; aplasia esplênica (suspeita). <u>Rim:</u> Congestão em cortical, medular; congestão.</p>

---

			<p><u>Sistema respiratório:</u>  <u>Pulmão:</u> hipercongestos com bordas bem delimitados e crepitantes.</p> <p><u>Sistema cardiovascular:</u>  <u>Coração:</u> toda superfície repleta de petéquias hemorrágicas sobre o miocárdio; petéquias e sufusões no endocárdio no átrio e ventrículo; saco pericárdico, líquido amarelo e vasos ingurgitados.</p>	
NEC 2626	<i>M. nana</i>	<p>Pelagem em bom estado e hidratado, membros toácicos e pévios sem alteração. Escore corporal: 2,0. Animal encontrado morto no recinto.</p>	<p><u>Exame externo:</u> Pelagem sem alterações.</p> <p><u>Exame interno:</u> <u>Sistema musculoesquelético:</u> Equimose extensa, mancha escura, aproximadamente 4,5 cm, na musculatura da coxa do membro pélvico direito; local usual de injeção intramuscular de ferro dextrano em filhotes.</p> <p><u>Cavidade abdominal:</u>  <u>Sistema digestório:</u>  <u>Estômago:</u> mucosa hipocorada com conteúdo caseoso esbranquiçado (leite materno). <u>Intestino:</u> presença de petéquias hemorrágicas, principalmente no ceco. <u>Fígado:</u> petéquias em toda superfície do órgão, abaulamento de bordas, friável.</p> <p><u>Sistema linfático:</u> <u>Baço:</u> friável, superfície hiperplásica centralmente, brilhante, bordas e cor normais.</p> <p><u>Sistema urogenital:</u> <u>Rim:</u> escuros, sem diferenciação entre áreas cortical e medular, friável, capsula</p>	<p><u>Musculatura:</u> Coxa direita e parte do abdominal direito com mancha escura, equimose extensa; aplicação medicamentosa.</p> <p><u>Estômago:</u> Hipocorada.</p> <p><u>Intestino:</u> Mucosa com petéquias hemorrágicas; endoflebite, distúrbios de coagulação; hemorragia.</p> <p><u>Fígado:</u> Petéquias hemorrágicas por toda superfície, hemorragias; endoflebite.</p> <p><u>Pulmão:</u> Congesto, petéquias hemorrágicas; hemorragia focal.</p> <p><u>Coração:</u> Endocárdio com petéquias hemorrágicas e hemorragias; endoflebite.</p> <p><u>Rim:</u> Congesto, sem diferenciação entre cortical e medular, friável; autólise.</p> <p><u>Vulva:</u> Congesto.</p>

desprendida com facilidade.

Vulva: congesta.

Cavidade torácica: presença de pressão negativa.

Sistema respiratório:

Pulmão: vasos pulmonares congestos na superfície do órgão, bem visíveis, formando rede venosa de aspecto retangular; pequenos vasos ingurgitados, congestos, visualizando-se uma rede microvascular; pontos hemorrágicos na superfície ventral e dorsal do órgão (bilatera), principalmente na superfície dorsal (hemorragia focal).

Sistema cardiovascular:

Coração: miocárdio sem alterações; cavidade endocárdica com coágulos cruóricos e poucas petéquias hemorrágicas.

NEC 2632

*M. nana*

Não informado

Exame externo: Pele e mucosas: Secreção lacrimal sanguinolenta. Câmara ocular anterior escurecida. Fezes hemorrágicas no ânus; melena.

Exame interno: Cavidade abdominal: Líquido sanguinolento, hemoperitônio.

Sistema digestório:

Intestino: alças intestinais bem vermelhas com conteúdo hemorrágico. Íleo com petéquias hemorrágicas na serosa. Mesentério com cisto hidático; Estômago: Serosa com vasos congestos, bem visíveis.

Ânus: Fezes hemorrágicas; melena; hemorragia intestinal.

Cavidade abdominal:

Líquido sanguinolento; hemoperitônio.

Cavidade torácica:

Líquido sanguinolento; hemotórax.

Intestino: Conteúdo

hemorrágico, petéquias hemorrágicas; vasculite/hemorragias.

Pulmão: Hiperemia; congestão.

Coração: Pericárdio, petéquias, líquido sanguinolento;

			<p><u>Sistema linfático:</u> <u>Baço:</u> superfície rugosa e petéquias hemorrágicas; superfície dorsal lisa e também com petéquias.</p> <p><u>Sistema urogenital:</u> <u>Rim:</u> Parênquima friável e liquefazendo-se; <u>Testículo:</u> sem hemorragia; epidídimo com petéquias.</p> <p><u>Cavidade torácica:</u> acúmulo de líquido sanguinolento.</p> <p><u>Sistema respiratório:</u> <u>Pulmão:</u> face dorsal, terço cranial, direito e esquerdo, escurecidos; congestão.</p> <p><u>Sistema cardiovascular:</u> <u>Coração:</u> pericárdio com vasos visíveis, congestos, acúmulo de líquido sanguinolento, hemopericárdio; pericárdio com petéquias hemorrágicas; endocárdio, áreas púrpuras.</p>	<p>hemopericárdio. Endocárdio, áreas púrpuras; vasculite/hemorragias.</p> <p><u>Baço:</u> Petéquias hemorrágicas; vasculites/hemorragias.</p> <p><u>Rim:</u> Friável, liquefeito; degeneração/ autólise.</p> <p><u>Testículo:</u> Leves petéquias hemorrágicas no epidídimo.</p>
NEC 2634	<i>M. nana</i>	Não informado	<p><u>Exame externo:</u> <u>Pele e mucosas:</u> Mucosas periocular e labial hiperêmicas. Língua com áreas hipocoradas e de aspecto edematoso. Fezes hemorrágicas no ânus.</p> <p><u>Exame interno:</u> <u>Cavidade abdominal:</u> Acúmulo de líquido sanguinolento, hemoperitônio; mesentério hiperêmico.</p> <p><u>Sistema digestório:</u> <u>Rúmen:</u> extensa área (6cm) de sufusão hemorrágica na serosa; <u>Intestino:</u> alças com petéquias hemorrágicas na serosa e com conteúdo escuro sanguinolento; <u>Fígado:</u> hipocorado e com</p>	<p><u>Pele e mucosas:</u> Periocular, mucosa labial; hiperemia.</p> <p><u>Ânus:</u> Fezes hemorrágicas; hemorragia intestinal.</p> <p><u>Cavidade abdominal:</u> Líquido sanguinolento; hemoperitônio.</p> <p><u>Cavidade torácica:</u> Líquido sanguinolento; hemotórax.</p> <p><u>Rúmen:</u> Serosa, sufusão hemorrágica; vasculite; hemorragias.</p> <p><u>Intestino:</u> Conteúdo hemorrágico, petéquias hemorrágicas em serosa; hemorragias.</p>

			<p>petéquias em toda sua extensão.</p> <p><u>Sistema linfático:</u> <u>Baço:</u> superfície rugosa e petéquias hemorrágicas por toda a extensão do órgão.</p> <p><u>Sistema urogenital:</u> <u>Rim:</u> medular hiperêmica;</p> <p><u>Testículo:</u> poucas petéquias hemorrágicas.</p>	<p><u>Fígado:</u> Hipocorado, petéquias hemorrágicas, vasculite; hemorragias.</p> <p><u>Pulmão:</u> Bilateral, hiperêmico, hemorrágico, petéquias, trombos hemorrágicos; vasculite, distúrbios de coagulação; trombose.</p> <p><u>Coração:</u> Miocárdio, hipocorado; endocárdio, púrpuras e petéquias, vasculite; hemorragias.</p> <p><u>Baço:</u> Petéquias hemorrágicas; hemorragias.</p> <p><u>Rim:</u> Medular, hiperemia; congestão.</p> <p><u>Testículo:</u> Leves petéquias hemorrágicas.</p>
			<p><u>Cavidade torácica:</u> acúmulo de líquido sanguinolento.</p> <p><u>Sistema respiratório:</u></p> <p><u>Pulmão:</u> hiperêmico e hemorrágico em toda extensão, entremeado por áreas claras com petéquias. Ao corte do órgão, áreas com trombos hemorrágicos pelo parênquima. Intensa congestão.</p> <p><u>Sistema cardiovascular:</u></p> <p><u>Coração:</u> miocárdio hipocorado com áreas mais claras e hemorrágicas. Ao corte, miocárdio hipocorado e endocárdio com púrpuras e petéquias.</p>	
NEC 2637	<i>M. nana</i>	Não informado	<p><u>Exame externo:</u> <u>Pele e mucosas:</u> Região submandibular com acúmulo de líquido amarelado, edema; língua para fora. Fezes hemorrágicas no ânus.</p> <p><u>Exame interno:</u> <u>Cavidade abdominal:</u> Acúmulo de líquido sanguinolento (mais de 10 mL).</p> <p><u>Sistema digestório:</u></p> <p><u>Intestinos:</u> delgado, serosa escura, avermelhada, hemorrágica. Gordura do mesentério hemorrágica, avermelhada.</p>	<p><u>Pele e mucosas:</u> Edema na face e submandibular; edema facial.</p> <p><u>Ânus:</u> Fezes hemorrágicas; hemorragia intestinal.</p> <p><u>Cavidade abdominal:</u> Líquido sanguinolento; hemoperitônio.</p> <p><u>Cavidade torácica:</u> Líquido sanguinolento; hemotórax.</p> <p><u>Intestino:</u> Conteúdo hemorrágico, hemorragia intestinal.</p>

Sistema linfático: Baço: aspecto rugoso e cor vermelha típica.

Sistema urogenital: Rim: vermelho escuro, região cortical vermelho vivo, medular vermelho escuro, hemorrágica; Útero: presença de embrião de 2 cm, aderido à parede uterina.

Cavidade torácica: Acúmulo de sangue (mais de 10 mL), hemotórax.

Sistema respiratório:

Traqueia: Escura na mucosa, presença de líquido espumoso branco (edema); Pulmão: bilateral, hiperêmico, face dorsal vermelho (hepatizado); microvasculatura evidente; congestão; hemorragia.

Sistema cardiovascular:

Coração: pericárdio espessado e repleto de líquido sanguinolento (mais de 5 mL), hemopericárdio; miocárdio, superfície repleta de petéquias hemorrágicas; Cérebro: Meningites hemorrágicas, lado direito com dois focos de hemorragia e microvasculatura cerebral congesta.

Traqueia: Escura na mucosa, líquido espumoso; edema pulmonar.

Pulmão: Hiperêmico, hemorrágico, hemorragia.

Coração: Pericárdio espessado, acúmulo de líquido sanguinolento; hemopericárdio.

Miocárdio, petéquias hemorrágicas na superfície; hemorragia/vasculite/coagulopatia.

Rim: Medular e cortical, hemorrágico, hemorragia.

Útero: Embrião de 2 cm; gestante.

Cérebro: Meningites, pontos hemorrágicos, congestão de vasos; hemorragia.

NEC 2642

**B.  
dichotom  
us**

Animal com escore corporal baixo e sem alterações nos membros torácicos e pélvicos. Reflexos

**Exame externo: Pele:**

Membros, com rarefação pilosa nos quatro membros, proximal às unhas (cascos), feridas aparentemente abrasivas na face medial dos membros direitos e na face lateral do membro torácico esquerdo. Membro pélvico esquerdo, ferida

Pele: Membros pélvicos e torácicos, região de boleto e quartela, lateral, rarefação pilosa, lesões abrasivas; lesões abrasivas por atrito (decúbito lateral). Membros: Pélvico, solução de

palpebrais e podais presentes. Apresentou anemia, emagrecimento progressivo e endoparasitias. Temperatura a 39°C. Peso: 18,4 Kg. Escore corporal: 2,0.

extensa de 2 cm de comprimento por 1 cm de largura, com descontinuidade de pele, exposição de tecido vermelho.

**Exame interno:** Cavidade abdominal: Acúmulo de líquido esbranquiçado e grumos brancos (10 mL). Sistema digestório: Intestinos: delgado, hipocorado e sem congestão. Sistema linfático: Linfonodos mesentéricos: com 1 cm, facilmente visíveis. Sistema urogenital: Rim: cor ocre e manchados, pontilhados de vermelho, petéquias.

Cavidade torácica: Sistema respiratório: Pulmão: rosáceo, microvasculatura evidente, congesta. Sistema cardiovascular: Coração: saco pericárdio com líquido sanguinolento, avermelhado; pericárdio esbranquiçado; miocárdio hipocorado, sem petéquias; epicárdio visível, esbranquiçado, indicando espessamento.

continuidade de pele, ferida com exposição de tecido vermelho; ferimento traumático. Cavidade abdominal: Acúmulo de líquido esbranquiçado, turvo, grumos brancos inflamatórios; peritonite localizada. Intestino: Hipocorado. Pulmão: Congesto. Coração: Pericárdio, espessado, acúmulo de líquido sanguinolento; epicárdio, com opacificação; hidropericárdio; pericardite. Rim: Cor ocre, pontilhado de vermelho; anemia/nefrose.

NEC 2644

*M. nana*

Apatia, alterações da consciência e fezes com sangue. Temperatura estava baixa.

**Exame externo:** Pele e mucosas: Edema submandibular e de língua (língua para fora). Mucosa nasal com sangue coagulado. Presença de hemorrágicas no ânus.

Pele e mucosas: Edema submandibular e de língua; edema. Ânus: Fezes hemorrágicas; hemorragia intestinal. Intestino: Hemorrágicos; hemorragias.

Peso:15  
Kg.

**Exame interno:** Cavidade abdominal:  
Sistema digestório: Rúmen: distendido, com presença de gás. Dois cistos hidáticos, um no mesentério e outro no mediastino;  
Intestinos, hemorrágico e presença de gás; Intestino grosso e ceco: hemorrágicos, com vasos ingurgitados; Fígado: bordas discretamente abauladas.  
Sistema linfático: Baço: túnica esbranquiçada, edemaciada, de aspecto inflamatório; parênquima com pontos esbranquiçados por todo parênquima.  
Sistema urogenital: Rim: escuro externamente, ao corte, friável, vermelho escuro por todo parênquima e pelve também hemorrágica; Vesícula urinária: Repleta de urina sanguinolenta.

Pulmão: Hiperemia, todo o órgão; hemorragia.  
Coração: Pericárdio, líquido sanguinolento, 35 mL; hemopericárdio. Epicárdio e endocárdio, petéquias e púrpura; hemorragia/vasculite.  
Baço: Túnica esbranquiçada, inflamada, parênquima com áreas esbranquiçadas pontuais difusos, hipertrofia linfoide; periesplenite, esplenite.  
Rim: Vermelho vivo, cortical e medular, hemorrágicas; hemorragia.  
Vesícula urinária: Repleta, urina sanguinolenta; hemorragia.

Cavidade torácica:

Sistema respiratório:

Pulmão: uniformemente hiperêmico.

Sistema cardiovascular:

Coração: saco pericárdio com líquido sanguinolento claro (aproximadamente 35 mL), miocárdio, epicárdio com petéquias hemorrágicas difusas, endocárdio com petéquias e púrpura.

---