

Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária  
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

**ESTUDO DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (BTV) E VÍRUS DA DOENÇA EPIZOÓTICA  
HEMORRÁGICA (EHDV) EM UNGULADOS DO JARDIM ZOOLOGICO DA FUNDAÇÃO DE  
PARQUES MUNICIPAIS E ZOOBOTÂNICA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS,  
BRASIL**

**Eduardo Alves Caixeta**

Belo Horizonte - MG

2023

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária  
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

**ESTUDO DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (BTV) E VÍRUS DA DOENÇA EPIZOÓTICA  
HEMORRÁGICA (EHDV) EM UNGULADOS DO JARDIM ZOOLOGICO DA FUNDAÇÃO DE  
PARQUES MUNICIPAIS E ZOOBOTÂNICA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS,  
BRASIL**

Eduardo Alves Caixeta

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência  
Animal da Escola de  
Veterinária da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como  
requisito para obtenção do grau  
de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:  
Medicina Veterinária  
Preventiva

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

Belo Horizonte - MG

2023

C138e Caixeta, Eduardo Alves, 1995 -  
Estudo do vírus da língua azul (btv) e vírus da doença epizootica hemorrágica (ehdv) em ungulados do Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil /Eduardo Alves Caixeta. – 2023. 117f: il

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva  
Bibliografias: f. 73 a 86.

1- Cervídeo – Doenças - Teses – 2. Vírus da língua azul – Teses -  
3. Doenças transmissíveis em animais – Teses - I. Lobato, Zélia Inês Portela –  
II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - EDUARDO ALVES CAIXETA

Às 14:00 horas do dia 16 de fevereiro de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

**“ESTUDO DO VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (BTV) E VÍRUS DA DOENÇA EPIZOÓTICA HEMORRÁGICA (EHDV) EM UNGULADOS DO JARDIM ZOOLOGICO DA FUNDAÇÃO DE PARQUES MUNICIPAIS E ZOOBOTÂNICA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL”**

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina Veterinária Preventiva**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Zelia Ines Portela Lobato**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Zelia Ines Portela Lobato	Sim	
Julia Angelica Goncalves da Silveira	Sim	
José Mauricio Barbanti Duarte	Sim	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Zelia Ines Portela Lobato**, Membro, em 16/02/2023, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Julia Angelica Goncalves da Silveira**, Professora do Magistério Superior, em 16/02/2023, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Mauricio Barbanti Duarte**, Usuário Externo, em 17/02/2023, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2065405** e o código CRC **98B73DE9**.

Dedico este trabalho à minha família, às professoras e aos amigos que me apoiaram durante este percurso.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Márcia e Délio, e ao meu irmão, Evandro, por todo apoio durante esta caminhada, aos incentivos para que faça o meu melhor e por estarem comigo nos momentos difíceis!

Aos meus outros familiares, pelo encorajamento e força em todas as ocasiões!

À minha orientadora, Profa. Dra. Zélia Lobato, reconheço e agradeço todo o suporte, saber, ensinamentos e por me guiar durante todo este importante percurso!

Às professoras do Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal (LPVA), Érica Costa e Maria Isabel Guedes, por todo o apoio e por serem exemplos de pesquisadores!

À Gra (Grazielle Cossenzo), gratidão pela paciência, colaboração e carinho durante toda esta jornada! Agradeço a sua disponibilidade!

A todos os experientes técnicos (as), às faxineiras (os) e aos porteiros, por toda a dedicação que possuem pela UFMG e por estarem sempre dispostos a ajudar com muito carinho e capacidade!

Ao professor Renato Lima e a todos os membros do seu laboratório pelo apoio e por fornecerem amostras e informações importantes para este projeto!

À pesquisadora Mari (Mariana Andrioli), agradeço, por ter me auxiliado durante todo este projeto. A sua colaboração foi essencial para que conseguisse cumprir esta pesquisa. Muito obrigado pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência e pelo companheirismo!

À Bárbara Longo e à Vic (Victória Lucchesi) pelo apoio, ajuda, respeito e tranquilidade que me deram durante todo este percurso!

À todos os membros da “Família LPVA”, meus respeitosos agradecimentos por terem me auxiliado nas diferentes etapas deste projeto!

Muito obrigado, em especial, a todos que se disponibilizaram a me acompanhar nas várias idas ao zoológico para colocar as armadilhas!

Aos meus amigos, pelo apoio e por me ajudarem a passar pelos momentos difíceis! Um agradecimento em especial ao Patrick Tomaz e à Pandy (Ana Carolina Rebouças) por todo apoio e compreensão, que me dedicaram neste momento importante da minha construção profissional.

Ao meu Mestre da Capoeira das Gerais Luís Flecha e aos companheiros de capoeira pelo apoio e as partilhas!

Agradeço à banca avaliadora por toda atenção, disponibilidade e pelas sugestões construtivas ao trabalho realizado.

Ao Instituto Pirbright por gentilmente ter cedido as armadilhas utilizadas neste experimento!

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

À todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado por tudo!

“É preciso imaginar Sísifo feliz.”  
(Albert Camus)

## RESUMO

Foram realizados, na Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH), estudos relacionados à *Orbivirus* e seus vetores. Foram recebidas amostras do banco de soro, de 2012 a 2021, e de animais manipulados em procedimentos de rotina da FPMZB-BH durante o período do projeto, 2021 a 2022. Um total de 72 amostras de soro de 14 espécies foram testadas e destas, 75% (54/72) foram soropositivas para Vírus da Língua Azul (BTV) e 19% (11/59) para Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV), todas originadas de espécies de hospedeiros susceptíveis à infecção pelo BTV e pelo EHDV, entre elas várias espécies de cervídeos. Durante este período foram realizadas as coletas de *Culicoides sp.* e identificou-se uma maior prevalência destes insetos nos meses de verão, especialmente em fevereiro. Foi identificado que maiores temperaturas, umidade e acúmulo de fezes, bem como a proximidade com animais de grande porte como camelos e elefantes podem estar relacionados com uma maior captura de *Culicoides*. Foram identificados *Culicoides* do grupo *guttatus* (Coquillett), 1904, *Culicoides venezuelensis* Ortiz & Mirsa, 1950, *Culicoides debilipalpis* Lutz, 1913, *Culicoides foxi* Ortíz, 1950, *Culicoides* do grupo *Limai*, *Culicoides pusillus* Lutz, 1913, *Culicoides paraensis* (Goeldi), 1905, *Culicoides insignis* Lutz, 1913. As espécies *C. insignis* e *C. pusillus* são vetores descritos como competentes para transmissão dos *Orbivirus* estudados, a primeira espécie consiste em 75% dos maruins coletados e a segunda 6%. Ademais, foi identificada uma espécie ainda não relatada no estado de Minas Gerais, *C. debilipalpis*, também suspeita de ser transmissora destes *Orbivirus*. Foi analisada a preferência alimentar de algumas espécies de *Culicoides* e demonstrado que o *C. insignis* se alimenta em cervídeos, cervo-nobre (*Cervus elaphus*) e cervo-dama (*Dama dama*). Diferentes espécies de *Culicoides* também foram identificadas alimentando-se em seres humanos, trazendo preocupação em relação à probabilidade de transmissão de arboviroses no local. Além destes estudos, foi realizada a sorotipificação de EHDV em uma amostra isolada um veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) que veio a óbito em 2020 na FPMZB-BH com sinais de doença hemorrágica. O sorotipo identificado foi EHDV-2.

Palavras-Chave: *Culicoides*; Zoológico; doenças de cervídeos; doenças hemorrágicas.

## ABSTRACT

Studies related to *Orbivirus* and its vectors were carried out at the Belo Horizonte Municipal Parks and Zoobotany Foundation (FPMZB-BH). Samples were received from the serum bank, from 2012 to 2021, and from animals handled in routine FPMZB-BH procedures during the project period, 2021 to 2022. A total of 72 serum samples from 14 species were tested and of these, 75% (54/72) were seropositive for Bluetongue Virus (BTV) and 19% (11/59) for Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV), all originating from host species susceptible to BTV and EHDV infection, including several species of deer. During this period, collections of *Culicoides* sp. were performed and a higher prevalence of these insects was identified in the summer months, especially in February. It was identified that higher temperatures, humidity and accumulation of feces, as well as proximity to large animals such as camels and elephants, may be related to a greater capture of *Culicoides*. *Culicoides* of the *guttatus* group (Coquillett), 1904, *Culicoides venezuelensis* Ortíz & Mirsa, 1950, *Culicoides debilipalpis* Lutz, 1913, *Culicoides foxi* Ortíz, 1950, *Culicoides* do grupo *Limai*, *Culicoides pusillus* Lutz, 1913, *Culicoides paraensis* (Goeldi), 1905, *Culicoides insignis* Lutz, 1913, were identified. The species *C. insignis* and *C. pusillus* are vectors described as competent for the transmission of the studied *Orbivirus*, the first species consists of 75% of the collected midges and the second 6%. Furthermore, a species not yet reported in the state of Minas Gerais was identified, *C. debilipalpis*, also suspected of being a transmitter of these *Orbiviruses*. The feeding preference of some species of *Culicoides* was analyzed and it was demonstrated that *C. insignis* feeds on deer, Red deer (*Cervus elaphus*) and European fallow deer (*Dama dama*). Different species of *Culicoides* were also identified feeding on humans, raising concerns about the likelihood of transmission of arboviruses at the site. In addition to these studies, EHDV serotyping was performed in an isolated sample of a Brown Brocket Deer (*Subulo gouazoubira*) that died in 2020 in the FPMZB-BH with signs of hemorrhagic disease. The identified serotype was EHDV-2.

Keywords: *Culicoides*; Zoo; deer diseases; hemorrhagic diseases.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estágios gonotróficos de *Culicoides punctatus*. A: Nulípara ou não pigmentado. B: Alimentada com sangue ou ingurgitada. C: Gravídica. D: Parida ou pigmentada (Larska et al., 2017). 35
- Figura 2: Mapa da vista aérea de parte da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH), com marcação dos locais em que foram instaladas as armadilhas para captura de *Culicoides* spp. Fonte: Imagem modificada de *GLand Measure*. 43
- Figura 3: Mapa de visitação da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH). 1. Armadilha próxima aos recintos do camelo e da lhama.; 2. e 3. Armadilhas próximas aos recintos do cervo-dama, cervo-nobre, cervo-do-pantanal e órix 4. Armadilha no recinto misto da Praça Nacional, que abriga antas, veados-catingueiros, tamanduás-bandeira e emas; 5. Armadilha próxima aos recintos do cobo-de-meia-lua e da zebra; 6. Armadilha entre os recintos dos elefantes e do rinoceronte branco. Fonte: Imagem modificada da Prefeitura de BH (2021). 43
- Figura 4: Gráfico do total de *Culicoides* coletados na FPMZB-BH para cada mês do projeto. 57
- Figura 5: Gráfico das médias preditivas das coletas de *Culicoides* na FPMZB-BH para cada mês do projeto. 57
- Figura 6: Total de *Culicoides* coletados por armadilha. 58
- Figura 7: Gráfico da comparação entre as médias preditas das coletas de *Culicoides* para cada armadilha utilizada na FPMZB-BH. 59
- Figura 8: Total de *Culicoides* por espécies e grupos identificados. 61
- Figura 9: Variação da quantidade de *Culicoides* de cada espécie e grupo capturados, segundo mês de captura. 63
- Figura 10: Padrão de migração das bandas da amostra extraída em gel de agarose 2%. 69

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características de segmentos genômicos e das proteínas codificadas pelos <i>Orbivirus</i> (Dilcher & Weidmann; 2012; Ratnier et al., 2016; Mertens et al., 2022).	19
Quadro 2: Hospedeiros de BTV e EHDV.	22
Quadro 3: Pranchas com imagens de asas de algumas das espécies de <i>Culicoides</i> já descritas em Minas Gerais.	37
Quadro 4: Primers utilizados para diagnóstico de BTV por qRT-PCR.	41
Quadro 5: Primers utilizados para diagnóstico de EHDV por qRT-PCR.	41
Quadro 6: Informações de cada localização das armadilhas.	44
Quadro 7: Lista de primers para sorotipagem de EHDV.	46
Quadro 8: Resultados do teste de IDGA por espécie estudada para BTV e EHDV utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH.	47
Quadro 9: Resultados do teste de IDGA por animal testado para BTV utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH, dividido por animal testado indicado pela data dos resultados. Foram omitidos resultados em datas similares.	48
Quadro 10: Resultados do teste de IDGA por animal testado para EHDV utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH, dividido por animal testado indicado pela data dos resultados. Foram omitidos resultados em datas similares.	49
Quadro 11: Comparação do resultados do teste de IDGA para BTV e EHDV nos diferentes anos testados, utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH. Foram omitidos resultados em datas similares	51
Quadro 12: Comparação entre os animais testados pelo qRT-PCR e pelo IDGA para BTV e para EHDV.	53
Quadro 13: Informações por dia de coleta de <i>Culicoides</i> na FPMZB-BH.	54
Quadro 14: Análise univariada e multivariada do Índice de Risco Relativo (IRR) de diferentes variáveis que podem ter afetado a quantidade de <i>Culicoides</i> em cada coleta.	54
Quadro 15: Padrão de asa do <i>C. debilipalpis</i> Lutz, 1913.	60
Quadro 16: Total de <i>Culicoides</i> identificados até o nível de espécie.	60
Quadro 17: Total de <i>Culicoides</i> identificados até grupo.	61
Quadro 18: Informações sobre espécies e grupos de <i>Culicoides</i> em relação ao estágio gonadotrófico, coletados na FPMZB-BH durante o período de dezembro de 2021 a novembro de 2022.	61
Quadro 19: Informações das espécies e grupos de <i>Culicoides</i> coletados na FPMZB-BH durante o período de dezembro de 2021 a novembro de 2022 em relação a cada armadilha utilizada.	62
Quadro 20: Informações das espécies e grupos de <i>Culicoides</i> coletados na FPMZB-BH durante o período de dezembro de 2021 a novembro de 2022 em relação a cada um dos meses das coletas.	62
Quadro 21: Resultado do sequenciamento das amostras extraídas do abdômen de <i>Culicoides</i> ingurgitados para análise da preferência alimentar.	65
Quadro 22: Espécies identificadas pelo sequenciamento de preferência alimentar com mais de 90% de similaridade em relação a cada espécie de <i>Culicoide</i> ingurgitado analisada.	66
Quadro 23: Espécies identificadas pelo sequenciamento de preferência alimentar com mais de 90% de similaridade em relação a cada espécie de <i>Culicoide</i> ingurgitado analisada, subdivididos pela armadilha em que foram capturados.	66
Quadro 24: Informações das porcentagens de similaridade dos sequenciamentos do segmento VP2 da amostra de EHDV isolada.	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

AHD	Doença Hemorrágica por Adenovírus
atm.	Atmosférica
BG-S	Bioagentes para atrair os insetos
BHK-21	Células de rim de hamster recém-nascido
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BT	Língua Azul
BTV	Vírus da Língua Azul
<i>C.</i>	<i>Culicoides</i>
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CASIB	Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
CCCCP	Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cox 1	<i>Citocromo Oxidase Subunidade 1</i>
Cyt b	<i>Citocromo b</i>
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
dsRNA	RNA de fita dupla
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHD	Doença Epizoótica Hemorrágica
EHDV	Vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EUA	Estados Unidos
FPMZB	Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica
FPMZB-BH	Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte
FZB-BH	Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte
hPa	Hectopascal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
IFN	interferon
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IRR	Índice de Risco Relativo
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
Kb	Kilo bases
KC	Células de <i>Culicoides sonorensis</i>
kg	Quilograma
km	Quilômetros

LPVA	Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal
m	Metros
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mat. Org.	Matéria Orgânica
máx	Máximo
med.	Média
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
mín.	Mínimo
ml	Mililitro
MV	Maedi-visna
NCBI	<i>National Center for Biotechnology information</i>
nm	Nanômetro
NS	Proteína viral não estrutural
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
°C	Graus Célsius
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIE	Período de Incubação Extrínseco
PNOC	<i>Prepronociceptina</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real
RIF	Reações de imunofluorescência
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
seg	Segmento
SN	Soroneutralização
SP	São Paulo
temp.	Temperatura
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
umi.	Umidade
UV	Radiação ultravioleta
v	Volts
VERO	Células de rim de macaco verde africano
VP	Proteína viral estrutural
WOAH	Organização Mundial da Saúde Animal
Z	Identificação da coleta de <i>Culicoides</i> no zoológico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. Jardim Zoológico de Belo Horizonte	18
3.2. <i>Orbivirus</i>	18
3.3. Vírus da língua azul (BTV) e vírus da doença epizoótica hemorrágica (EHDV)	20
3.3.1. Etiologia	20
3.3.2. Transmissão	20
3.3.3. Distribuição geográfica	21
3.3.4. Hospedeiros	22
3.3.5. Epidemiologia em animais selvagens do Brasil:	26
3.3.6. BTV e EHDV em Zoológicos	27
3.3.7. Patogenia	29
3.3.8. Sinais clínicos	30
3.3.9. Patologia	31
3.3.10. Diagnóstico	32
3.3.11. Prevenção e controle	33
3.4. <i>Culicoides</i>	34
3.4.1. <i>Culicoides</i> no Brasil com foco no Estado de Minas Gerais	36
3.4.2. Preferência alimentar	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Locais do experimento	39
4.2. Autorizações	39
4.3. Amostras estudadas	39
4.3.1. Amostras de soro e sangue total dos animais vivos da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH)	39
4.3.2. Amostras do banco de soro da FPMZB-BH	39
4.3.3. Amostras de tecido de cervídeos que vieram a óbito na FPMZB-BH	40
4.4. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) de BTV e EHDV	40
4.4.1. Produção do antígeno para IDGA de BTV e EHDV	40
4.4.2. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)	40
4.5. Lavagem de hemácias	40
4.6. Reação em cadeia polimerase em tempo real (qRT-PCR) para diagnóstico de BTV e EHDV	41
4.7. Isolamento de BTV e EHDV	42
4.8. <i>Culicoides</i>	42
4.8.1. Captura dos <i>Culicoides</i>	42

4.8.2. Identificação <i>Culicoides</i>	45
4.8.3. Teste de identificação da preferência alimentar das espécies de <i>Culicoides</i> identificadas	45
4.9. Sorotipagem de EHDV por sequenciamento do seg-2	45
4.10. Estudo epidemiológico	46
4.11. Estatística	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Testes sorológicos	47
5.2. Testes moleculares em animais vivos e necropsiados	52
5.3. <i>Culicoides</i>	53
5.3.1. Coletas dos <i>Culicoides</i>	53
5.3.2. Identificação morfológica dos <i>Culicoides</i>	60
5.3.3. Teste de preferência alimentar	65
5.4. Sorotipagem de EHDV por sequenciamento	69
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXOS	87
8.1. Anexo 1: SISBIO	87
8.2. Anexo 2: Autorização Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG	92
8.3. Anexo 3: Carta de Anuência da FPMZB-BH	112
8.4. Anexo 4: Laudo Anatomopatológico 20/00337.	113
8.5. Anexo 5: Sequências do Seg-2 da amostra Zoo utilizada para a sorotipagem.	116

## 1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Língua Azul (BTV - *Bluetongue virus*) e o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV - *Epizootic hemorrhagic disease virus*) são membros da ordem Reovirales, família Sedoreoviridae e pertencem ao gênero *Orbivirus* (ICTV, 2022). Os membros deste gênero, em especial o BTV, são conhecidos por causar surtos de doenças em diferentes partes do mundo tanto em animais domésticos quanto em selvagens (Savini *et al.*, 2011; Spickler, 2015; Maclachlan *et al.*, 2019).

Os *Orbivirus* são não envelopados, com genoma segmentado de fita dupla de RNA (dsRNA). Seus segmentos genômicos são identificados de 1 a 10 (seg-1 a seg-10) e codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7), que compõem as partículas virais, e quatro proteínas não estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3a e NS4). Devido ao genoma ser de RNA segmentado é possível a ocorrência de mutações e rearranjos (Anthony *et al.*, 2009; Attoui *et al.*, 2009; Maan *et al.*, 2010; Savini *et al.*, 2011; Maan *et al.*, 2011; Maan *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Attoui *et al.*, 2016; Belbis *et al.*, 2017; Maclachlan *et al.*, 2019; Sailleau *et al.*, 2019; Bumbarov *et al.*, 2020).

O BTV atualmente é agrupado em 24 sorotipos clássicos de notificação obrigatória e, além disto, existe um número crescente de sorotipos denominados de “atípicos”, sendo o número total atualmente, somando os clássicos e os atípicos, de 36 e não há proteção cruzada entre os sorotipos (Caballero-Gómez *et al.*, 2021; Ries *et al.*, 2021; WOA, 2021). Já o EHDV possui sete sorotipos identificados. Tanto o BTV quanto o EHDV podem ser divididos em dois grandes grupos, os vírus do Leste e do Oeste (Savini *et al.*, 2011; Belbis *et al.*, 2017; Maclachlan *et al.*, 2019; Ries *et al.*, 2021).

O BTV e o EHDV são arbovírus transmitidos principalmente pelo seu vetor biológico, *Culicoides* spp. Latreille, 1809, insetos hematófagos da ordem Diptera, infectados com sangue de animais virêmicos (Mellor, Carpenter & White, 2009; McGregor *et al.*, 2021; Rao *et al.*, 2017). *Culicoides insignis* Lutz, 1913, e *C. pusillus* Lutz, 1913, são os vetores comprovadamente competentes descritos no Brasil (Greiner *et al.* 1992; Mo *et al.* 1994; Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Mellor, Carpenter & White, 2009; McGregor *et al.*, 2021).

Estes *Orbivirus* possuem diversos hospedeiros vertebrados, em especial ruminantes domésticos e selvagens, podendo infectar membros das famílias Cervidae, Bovidae, Camelidae, Giraffidae, Elephantidae entre outros. E são conhecidos por causarem surtos em diferentes partes do mundo (Spickler & Roth, 2006; Savini *et al.* 2011; Spickler, 2015; Maclachlan *et al.*, 2019). A infecção por estes vírus leva a danos do endotélio vascular causando hemorragias de membranas mucosas e pele, edema disseminado, infarto tecidual, febre, apatia, hiperemia, claudicação, distúrbios respiratórios, erosões e úlceras orais, abortos, natimortos e morte (Maclachlan 2009; Savini *et al.*, 2011). Como os sinais clínicos do BTV e EHDV são similares e ambos compartilham hospedeiros susceptíveis, é necessário o diagnóstico laboratorial para diferenciar as duas infecções, já que nas maiorias das áreas endêmicas ambos os vírus circulam ao mesmo tempo (Stallknecht e Howerth, 2004; Dommergues *et al.*, 2019). Para o diagnóstico de EHDV e de BTV podem ser utilizados tanto métodos sorológicos quanto moleculares (WOAH 2019a, b). Os animais que sobrevivem à infecção possuem anticorpos contra o sorotipo que o infectou.

No Brasil já foram identificados, por métodos diretos, dez sorotipos de BTV (BTV-1, 3, 4, 12, 14, 17, 18, 19, 22 e 24) e dois de EHDV (EHDV-1 e 2) (Favero *et al.*, 2013; Lobato *et al.*, 2015; Baldini, 2016; Lima *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2016; Baldini *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018; comunicação interna). Além disto, foram identificados animais soropositivos para outros dez sorotipos de BTV no Brasil (BTV-1, 2, 8, 9, 10, 13, 16, 20, 21 e 26) (Lobato *et al.*, 2015; Kawanami *et al.*, 2018; Da Silva *et al.*, 2018). BTV e EHDV são doenças de notificação obrigatória para a Organização Mundial da Saúde Animal (WOAH) (OIE, 2008; WOA, 2019a, b) e para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2013). Apesar disto, é possível que a quantidade de relatos esteja subnotificada já que o Brasil se encontra em uma região endêmica (Lobato *et al.*, 2015; Kawanami *et al.*, 2018).

Surtos de BTV e EHDV afetando cervídeos foram descritos em centros de conservação, zoológicos e mantenedores de fauna silvestre do Brasil (Duarte & Arita, 1992; Morato *et al.*, 1993; Kawanami *et al.*, 2012; Favero *et al.*, 2013; Baldini, 2016; Kawanami *et al.*, 2017; Baldini *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018). No zoológico de Pomerode, Santa Catarina um veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) veio a óbito por infecção de EHDV-2 e no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), no Paraná foram relatados veados-bororó (*Mazama nana*) e Cervos-do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) infectados por BTV-3, 12, 14, 18, 19, 22 e 24 e EHDV-1 e 2 (Favero *et al.*, 2013; Baldini, 2016; Baldini *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018). Em São

Paulo já foram detectados cervídeos infectados por BTV (Kawanami *et al.*, 2012; Kawanami *et al.*, 2017)

A melhor forma de controle de BTV e de EHDV é o uso de vacinas, porém atualmente não existe nenhuma autorizada para uso no Brasil já que ainda não se sabe ao certo quais os sorotipos circulantes em cada região e existem poucos casos clínicos notificados. Além da vacinação, existem outras formas de prevenção da transmissão destes vírus, relacionadas a diminuição da exposição dos animais aos insetos. Outras medidas importantes para prevenção de surtos dessas doenças são: quarentena, programas de vigilância, animais sentinelas, controle do movimento de animais, monitoramento de animais selvagens susceptíveis, diagnóstico de animais assintomáticos, assim como a melhora na comunicação de casos destas doenças, para os órgãos oficiais, para um melhor entendimento de sua distribuição (Lobato *et al.*, 2015; Spickler, 2015; OIE, 2018; Spickler, 2019; Saminathan *et al.*, 2020).

Surtos de BTV e EHDV podem levar a óbito espécimes importantes de ruminantes selvagens presentes em zoológicos, o que se traduz em uma grande perda para o meio ambiente, para a ciência e para as instituições. Outro ponto importante é o impacto que estas doenças podem causar na importação e exportação de animais entre zoológicos e mantenedores de fauna silvestre, além de atrapalhar a soltura de certas espécies na natureza por meio de programas de conservação que são desenvolvidos nestes ambientes, regulamentada pela IN23 do ICMBio (2014), já que tal regulamento prevê a soltura somente após a realização de exames que averiguem o estado geral de saúde dos animais. Além disso, é possível a introdução destes vírus por meio de animais do zoológico, o que poderia levar a graves perdas econômicas em rebanhos de ruminantes domésticos, já que pela principal via de transmissão ser por dípteros hematófagos não é necessário contato direto entre animais infectados e suscetíveis (House *et al.*, 1982; Nol *et al.*, 2010; England *et al.*, 2020).

No início do ano de 2020, houve um caso de doença hemorrágica em uma fêmea de Veado Catingueiro que veio a óbito no Jardim Zoológico de Belo Horizonte, sendo confirmado por reação em cadeia polimerase em tempo real (qRT-PCR) infecção por EHDV (Maan *et al.*, 2016). Novas questões foram levantadas, principalmente em relação à distribuição dos *Orbivirus* no zoológico. Este fato estimulou a elaboração do projeto para estudar melhor a distribuição destes vírus na FPMZB-BH e também alguns fatores de risco que pudessem estar associados à ocorrência dessas doenças. Para a prevenção de possíveis surtos de BTV e EHDV no Jardim Zoológico de Belo Horizonte é necessário o estabelecimento de medidas de controle de forma estratégica. Por conseguinte, buscamos por meio deste projeto estudar a circulação de BTV e EHDV na FPMZB-BH, permitindo auxiliar no estabelecimento de procedimentos para lidar com estes vírus neste ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Efetuar um estudo epidemiológico sobre a circulação dos Vírus da Língua Azul (BTV) e Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV) em animais da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes sorológicos para BTV e EHDV em amostras de soros dos animais da FPMZB-BH, que foram coletadas de 2021 a 2022;
- Realizar testes sorológicos para BTV e EHDV em amostras de animais presentes no banco de soro da FPMZB-BH;
- Realizar testes moleculares para BTV e EHDV em amostras biológicas de animais que vierem a óbito de 2021 a 2022 e apresentarem sinais sugestivos para doenças hemorrágicas;
- Coletar e identificar *Culicoides* spp. na FPMZB-BH em diferentes meses do ano;
- Identificar a existência de espécies de *Culicoides* por análises morfológicas;

- Analisar a preferência alimentar de diferentes espécies de *Culicoides* capturados na FPMZB-BH;
- Realizar a análise dos diferentes fatores de risco ligados a transmissão de BTV e EHDV na FPMZB-BH;
- Sorotipar amostra de EHDV proveniente da FPMZB-BH por meio do sequenciamento do segmento 2 do vírus.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Jardim Zoológico de Belo Horizonte

O Jardim Zoológico de Belo Horizonte foi inaugurado em 25 de janeiro de 1959. Em 1991, foi criada a Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (FZB-BH), que passou a abrigar o zoológico e o Jardim Botânico, e em 2017, após reformas administrativas por parte da prefeitura de Belo Horizonte, o Zoológico passou a ser administrado pela Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH). A FZB-BH possui uma área de 1.750 mil m<sup>2</sup>, estando localizada nas coordenadas 19° 51' 35" S 44° 0' 38" O, estando localizado na região da Pampulha em Belo Horizonte, Minas Gerais. O Zoológico possui mais de 3,5 mil animais, de mais de 250 espécies pertencentes aos grupos dos répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos, além de mil insetos de cerca de 20 espécies diferentes no Borboletário. Estes animais foram obtidos por permuta com outras instituições, doações supervisionadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), nascimento dentro do Zoológico, dentre outros. A FZB-BH é considerada um zoológico urbano, possuindo em seu entorno uma área residencial com maioria de casas, além de possuir em sua proximidade a Lagoa da Pampulha com perímetro de 18 km, sendo uma lagoa imprópria para banho devido a diversos poluentes. A vegetação do zoológico é formada por Cerrado e florestas estacionais semidecíduais (sendo uma área de preservação ambiental), já seu entorno possui uma maioria de vegetação secundária em diferentes estágios de regeneração natural e um misto de áreas agrícolas e pecuárias. A FPMZB-BH é classificada pelo IBAMA na "Categoria A" dos "jardins zoológicos públicos" por sua elevada qualidade técnica, infraestrutura e relevância dos seus programas de pesquisa científica e conservação da fauna (FPMZB, 2019).

#### 3.2. *Orbivirus*

*Orbivirus* são vírus não envelopados, com genoma segmentado de fita dupla de RNA (dsRNA) e capsídeo icosaédrico, com 65 a 75 nm de diâmetro. Os segmentos genômicos destes vírus variam de cerca de 4 kb até menos de 1kb, tendo um tamanho total de cerca de 19 kb, e são identificados como segmentos 1 a 10 (seg-1 a seg-10). Os segmentos codificam sete proteínas estruturais (VP1 a VP7), que compõem as partículas virais, e quatro proteínas não estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3a e NS4). Devido a este genoma ser de RNA segmentado é possível a ocorrência de deriva genética e mutações, especialmente com rearranjo de segmentos de diferentes vírus que coinfetam a mesma célula no hospedeiro, podendo ocorrer a formação de novos subtipos. O BTV é o vírus de referência para os estudos deste gênero (Anthony *et al.*, 2009; Attoui *et al.*, 2009; Maan *et al.*, 2010; Savini *et al.*, 2011; Maan *et al.*, 2011; Maan *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Attoui *et al.*, 2016; Belbis *et al.*, 2017; Maclachlan *et al.*, 2019; Sailleau *et al.*, 2019; Bumbarov *et al.*, 2020).

O capsídeo externo dos *Orbivirus* é composto pelas proteínas VP2 (seg-2) e VP5 (seg-6), que são proteínas menos conservadas, sendo a VP2 a principal determinante do sorotipo dos vírus, responsável pela ligação dos receptores, hemaglutinação e principal indutor de anticorpos neutralizantes. O núcleo interno do vírus é composto pelas proteínas VP1 (Seg-1), VP3 (seg-3), VP4 (seg-4), VP6 (seg-9) e VP7 (seg-7), em especial pelas VP7 e VP3. As proteínas VP1, VP4 e VP6 estão presentes no interior do subnúcleo envolvendo o genoma. Já as proteínas não estruturais são produzidas durante a replicação viral e são altamente conservadas entre os sorotipos. A lista detalhada das propriedades e funções de cada proteína produzida por cada segmento do genoma dos *Orbivirus* está descrita no Quadro 1 (Anthony *et al.*, 2009; Attoui *et al.*, 2009; Maan *et al.*, 2010; Savini *et al.*, 2011; Maan *et al.*, 2011; Dilcher & Weidmann; 2012; Maan *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Attoui *et al.*, 2016; Ratnien *et al.*, 2016; Belbis *et al.*, 2017; Maclachlan *et al.*, 2019; Sailleau *et al.*, 2019; Bumbarov *et al.*, 2020; Mertens *et al.*, 2022).

Os *Orbivirus* possuem uma grande variedade de hospedeiros vertebrados podendo infectar marsupiais, equinos, seres humanos, roedores, morcegos, macacos, preguiças, ruminantes, aves, entre outros (Nol *et al.*, 2010; Savini *et al.*, 2011; Niedbalski *et al.*, 2015; Spickler, 2015; More *et al.*, 2017; Spickler, 2019; Rivera *et al.*, 2021). Os membros deste gênero, em especial o BTV, são conhecidos por causar surtos em diferentes partes do mundo (Spickler & Roth, 2006; Savini *et al.* 2011; Spickler, 2015; Maclachlan *et al.*, 2019).

Quadro 1: Características de segmentos genômicos e das proteínas codificadas pelos *Orbivirus* (Dilcher & Weidmann; 2012; Ratniner *et al.*, 2016; Mertens *et al.*, 2022).

Segmento do genoma	Nº pares de bases	Proteína codificada	Localização, propriedades e funções
1	3954	VP1 (Pol)	RNA-polimerase RNA dependente
2	2926	VP2	Camada externa do capsídeo externo; determinante do sorotipo viral (imuno determinante); proteína de ligação aos receptores celulares e penetração nas células de mamíferos; segmento e proteína mais variável; hemaglutinina; principal epitopo neutralizante
3	2770	VP3 (T2)	Proteína mais interna do capsídeo interno; forma a superfície interna do núcleo; controla o tamanho e a organização da estrutura do capsídeo; liga ao RNA; proteína altamente conservada; auxilia na determinação da origem geográfica do isolado.
4	1981	VP4 (Cap)	Enzima Cap; dímero; guanililtransferase; transmetilase.
5	1769	NS1 (TuP)	Forma túbulos no citoplasma celular que são característicos da replicação de <i>Orbivirus</i> .
6	1638	VP5	Camada interna do capsídeo externo; segunda proteína mais variável; causa a fusão da membrana viral e celular; influencia as características conformacionais da VP2; envolvido na determinação do sorotipo e na imunogenicidade.
7	1156	VP7 (T13)	Camada mais externa do capsídeo interno; forma a superfície externa do núcleo; determinante do sorogrupo, reflete a origem geográfica dos isolados; terceiro segmento mais variável do genoma; envolvida na penetração de células de insetos; envolvida na alta infectividade em insetos vetores e células de mamíferos.
8	1124	NS2 (ViP)	Importante proteína da matriz do corpúsculo de inclusão viral; ligação de ssRNA; fosforilada por quinases celulares que pode afetar a ligação do RNA.
9	1046	VP6 (Hel)	Helicase de ligação de ssRNA e dsRNA ; NTPase
		NS4	Possível antagonista de interferon; envolvida na determinação da virulência
10	822	NS3/NS3a	Glicoproteínas; proteínas de membrana; envolvidas na saída do vírus da célula; citotóxica, pode romper a membrana celular; importante para a infecção e transmissão pelo inseto vetor.

### 3.3. Vírus da língua azul (BTV) e vírus da doença epizootica hemorrágica (EHDV)

#### 3.3.1. Etiologia

O Vírus da Língua Azul (BTV - *Bluetongue virus*) e o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (EHDV - *Epizootic hemorrhagic disease virus*) são membros do filo Duplornaviricota, classe Resentoviricetes, ordem Reovirales, família Sedoreoviridae e pertencem ao gênero *Orbivirus* (ICTV, 2022). Ambos são arbovírus transmitidos por dípteros hematófagos do gênero *Culicoides* (Mellor, Carpenter & White, 2009; McGregor *et al.*, 2021; ICTV, 2022).

São conhecidos atualmente 24 sorotipos “clássicos” de BTV (BTV-1 a BTV-24), porém, existe um número crescente de sorotipos denominados de “atípicos” que, em conjunto com os “clássicos”, somam 36 (BTV-1 a BTV-36). Já o EHDV possui atualmente sete sorotipos identificados (EHDV-1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8). O sorotipo 3 foi agrupado como EHDV-1, o sorotipo 9 como EHDV-6 e o vírus de Ibaraki, que foi identificado no Japão em 1959, foi classificado como EHDV-2 (Uchinuno *et al.*, 2003; Anthony *et al.*, 2009; Savini *et al.*, 2011; Maclachlan *et al.*, 2019).

Tanto o BTV quanto o EHDV podem ser divididos em dois grandes grupos, os vírus do Leste e do Oeste, podendo determinar a origem do isolado viral. Esta identificação pode ser realizada pela análise do seg-7 (Savini *et al.*, 2011; Belbis *et al.*, 2017; Maclachlan *et al.*, 2019).

Os sorotipos, tanto de BTV quanto de EHDV, apresentam variação antigênica entre si e podem apresentar virulência, patogenia, tropismos teciduais e sinais clínicos diferentes nos mesmos hospedeiros. Alguns sorotipos podem resultar em reações cruzadas em testes sorológicos com outros do mesmo sorogrupo, porém, não há proteção cruzada entre os sorotipos. Desta forma, existe o risco da introdução de um sorotipo exótico levar a surtos em animais que já tiveram contato com outros sorotipos do vírus (Batten, *et al.* 2008; Attoui *et al.*, 2009; Mellor, Carpenter & White, 2009; Caballero-Gómez *et al.*, 2021; Ries *et al.*, 2021; WOA, 2021).

O genoma segmentado dos *Orbivirus* apresenta variação entre cada espécie dentro deste gênero, sendo que o BTV e o EHDV possuem um peso molecular de seus segmentos semelhantes, de forma que ao serem analisados em um gel de eletroforese seu padrão de migração das bandas é de 3-3-3-1, havendo diferença somente na migração do seg-7 e seg-8, que no BTV são mais separados e no EHDV são quase indistinguíveis (Maan *et al.*, 2007; Anthony *et al.*, 2009). Outra característica importante do genoma segmentado destes vírus é a possibilidade de ocorrer recombinação do genoma de vírus da mesma espécie durante coinfeções, seja com o envolvimento de diferentes sorotipos ou não, sendo este evento, em conjunto com mutações, os principais responsáveis pela diversidade genética destes *Orbivirus* (Alfieri, *et al.* 2017).

Tanto a Língua Azul (BT) quanto a Doença Epizootica Hemorrágica (EHD) são doenças de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH, 2019a; WOA, 2019b) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Instrução Normativa No 50, de 24 de setembro de 2013 (MAPA, 2013)

#### 3.3.2. Transmissão

A BT e a EHD são arboviroses, agudas, infecciosas, não contagiosas, principalmente transmitidas pelo seu vetor biológico *Culicoides* Latreille, 1809, insetos hematófagos da ordem Diptera, popularmente denominado no Brasil de maruim, mosquito pólvora ou mosquito do manguê (Mellor, Carpenter & White, 2009; Lobato *et al.*, 2015; McGregor *et al.*, 2021). Existem mais de 1,3 mil espécies de *Culicoides* em todo globo, porém até agora somente cerca de 30 espécies são identificadas como vetores de BTV e EHDV. *Culicoides insignis* Lutz, 1913, o *C. pusillus* Lutz, 1913, são os únicos vetores comprovadamente competentes descritos no Brasil (Greiner *et al.* 1992; Mo *et al.* 1994; Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Mellor, Carpenter & White, 2009; McGregor *et al.*, 2021).

Por estes insetos serem a principal forma de transmissão do BTV e EHDV, a ocorrência das doenças fica limitada às áreas em que estes dípteros são encontrados, como regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo. Pela ocorrência da transmissão destes vírus estar relacionada com a abundância de vetores adultos em certas épocas do ano, elas ocorrem de forma sazonal, sendo mais observada nos períodos quentes e úmidos, refletindo o crescimento da população de *Culicoides*, e diminuindo nos períodos secos e frios, quando ocorre uma redução na população destes insetos (Greiner *et al.* 1992; Mo *et al.* 1994; Mellor, Boorman & Baylis, 2000;

Meiswinkel *et al.*, 2004; Stallknecht e Howerth, 2004; Mellor, Carpenter & White, 2009; Lobato *et al.*, 2015; McGregor *et al.*, 2021).

Existem outras formas de transmissão já relatadas para o BTV além do vetor biológico. No caso de carnívoros, foi relatada a ingestão de animais infectados, placenta infectada e fetos abortados como uma possível via de infecção (Alexander *et al.*, 1994; Jauniaux *et al.*, 2008). Cães inoculados com vacinas contaminadas foram susceptíveis e as cadelas infectadas desta forma abortaram e morreram (Wilbur *et al.*, 1994; Evermann, 2008). A transmissão mecânica por outros artrópodes como carrapatos e outros mosquitos foi identificada (Brown *et al.*, 1992; Bouwknecht *et al.*, 2010). O sêmen de touros virêmicos pode transmitir o vírus em casos que exista presença de células sanguíneas (Osburn, 1994; Kirkland *et al.*, 2004). A transmissão transplacentária foi relatada tanto no caso de infecções naturais quanto em animais vacinados com vacinas vivas atenuadas, especialmente no caso do sorotipo 8 (Wilbur *et al.*, 1994; Flanagan and Johnson, 1995; Santman-Berends *et al.*, 2010; Saegerman *et al.*, 2011). Foi relatada também transmissão via colostro (Mayo *et al.*, 2010). Outras formas de transmissão já relatadas são contato entre animais infectados no caso dos sorotipos 25, 26 e 27 e a transmissão iatrogênica por equipamentos cirúrgicos contaminados e agulhas contendo sangue infectado. Apesar desta grande variedade de formas de transmissão, a infecção por outras vias, fora a picada do vetor biológico, é rara e considerada de baixa importância para a manutenção destas doenças (Attoui *et al.*, 2009; MacLachlan *et al.*, 2009; Attoui *et al.*, 2016; Saminathan *et al.*, 2020).

### 3.3.3. Distribuição geográfica

A BT foi inicialmente identificada e descrita na África do Sul, tendo sido relatada desde o século 18. A primeira descrição do quadro clínico foi realizada por Hutcheon em 1880, mas o primeiro relato científico foi feito somente em 1902. Inicialmente foi descrita como “febre catarral malárica” e posteriormente ganhou o nome “bluetongue” da forma anglicizada do africâner “bloutong”, nome dado pelos fazendeiros sul africanos para descrever o aspecto cianótico da língua dos animais afetados (Hutcheon, 1902; Spreull, 1905; Henning, 1956; MacLachlan *et al.*, 2009).

A BT já foi identificada em todos os continentes exceto a Antártida, sendo sua distribuição similar a presença do vetor biológico, *Culicoides* spp., além disto os sorotipos e hospedeiros afetados também variam de acordo com a espécie de *Culicoides* de cada região, formando o que é denominado de epissistemas. Os locais em que a doença ainda não foi relatada são considerados como áreas enzoóticas (Tabachnick, 2004; Mellor, Carpenter & White, 2009). Apesar do BTV já ter sido identificado em praticamente todo globo, sua distribuição está mudando devido às mudanças climáticas advindas do aquecimento global, principalmente pelos impactos nas populações de *Culicoides* locais resultando, assim, em surtos de BT em locais que antes só observavam casos esporádicos (Purse *et al.*, 2008; Saegerman *et al.*, 2008; Wilson and Mellor, 2008).

O EHDV foi primeiramente isolado de um veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) no estado de Nova Jersey, EUA, em 1955, que veio à óbito durante um surto que levou a morte de 500 a 700 veados (Shope *et al.*, 1960). Este vírus foi relatado na América do Norte, América do Sul, Europa, Ásia e África (Shope *et al.*, 1960; Weir *et al.*, 1997; Eschbaumer *et al.*, 2012; Cêtre-Sossah *et al.*, 2014; Alfieri *et al.*, 2017; Shirafuji *et al.*, 2017; Favero *et al.* 2013).

As áreas de ocorrência de BT e EHD podem ser divididas em três: epidêmicas, endêmicas e incursivas. Esta divisão é baseada na presença de hospedeiros, vetores biológicos e fatores ambientais como temperatura e umidade. Estas áreas são dinâmicas e podem mudar de classificação por inúmeros motivos, como pelo aumento do número de vetores devido ao aquecimento global e pela introdução de hospedeiros em novos locais. As áreas endêmicas são regiões de clima tropical, com vetores competentes transmitindo estas doenças durante todo ano, sendo observado alto número de animais soropositivos e rara ocorrência de doença clínica. As áreas epidêmicas são regiões de clima subtropical e temperado, com sazonalidade da atividade dos vetores, sendo mais ativos nos períodos de maior temperatura e umidade, assim variando a soropositividade dos animais ao longo do ano e ocorrendo surtos de forma periódica. Já as áreas incursivas são locais que normalmente não se observa animais soropositivos e doenças, mas que podem ocorrer surtos associados a mudanças climáticas. Desta forma, é possível concluir que a América do Sul e em especial o Brasil se encontram em sua maioria em zonas endêmicas e epidêmicas, assim, demonstrando um risco que estas doenças apresentam para este local (Lobato *et al.*, 2015; Ruder *et al.*, 2015).

Na América do Sul, por meio de testes sorológicos em animais selvagens e domésticos, foi identificado que o BTV está circulando em todo o continente pelo menos desde 1975, já o EHDV foi primeiramente identificado somente em 1984 na Guiana (Grocock & Campbell, 1982; Lobato *et al.*, 2015). Já no Brasil, foram identificados nove sorotipos de BTV (BTV- 3, 4, 12, 14, 17, 18, 19, 22 e 24) e dois de EHDV (EHDV-1 e 2) (Favero *et al.*, 2013; Lobato *et al.*, 2015; Baldini, 2016; Lima *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2016; Baldini *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018; comunicação interna). Além disto foram identificados animais soropositivos para outros dez sorotipos de BTV (BTV-1, 2, 8, 9, 10, 13, 16, 20, 21 e 26) (Lobato *et al.*, 2015; Kawanami *et al.*, 2018; Da Silva *et al.*, 2018). E em Minas Gerais, Brasil, já foi isolado o BTV-4 e o 24 de ovinos (Lima *et al.*, 2016; comunicação pessoal).

### 3.3.4. Hospedeiros

A BT e a EHD acometem uma grande variedade de ruminantes domésticos e silvestres, causando doenças principalmente em ovinos e cervídeos. Bovinos, caprinos e outros ruminantes são normalmente assintomáticos ou subclínicos, com algumas exceções, como o BTV-8 que circula na Europa (Henrich *et al.*, 2007; Saegerman *et al.*, 2008; Conraths *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2009; Favero *et al.*, 2013; Baldini *et al.*, 2018; Maclachlan *et al.*, 2019). A mortalidade de BTV em ovinos pode chegar a 30%, podendo ser maior dependendo do sorotipo. Bovinos, por serem geralmente assintomáticos e possuírem um grande período de infecção pela viremia longa, são considerados como possíveis reservatórios para estes vírus. Tanto o BTV quanto o EHDV apresentam alta morbidade e mortalidade em certas espécies de ruminantes selvagens, podendo chegar em alguns casos até 90% de mortalidade, como em algumas espécies de cervídeos. Assim, estas doenças são um grave risco para a conservação de cervídeos (Gibbs e Lawman, 1977; Stallknecht and Howerth, 2004; Baldini *et al.*, 2018; Maclachlan *et al.*, 2019; Baldini & Moraes, 2021). O BTV e o EHDV possuem muitos hospedeiros susceptíveis que já foram identificados, por testes sorológicos e de identificação viral, como positivos, como pode ser visualizado no Quadro 2.

Quadro 2: Hospedeiros de BTV e EHDV. \*A -> Pesquisa de anticorpos. \*\*V -> Pesquisa de vírus.

Nome comum	Espécie	Vírus	Identificação	Referência
Adax	<i>Addax nasomaculatus</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017
Alce	<i>Alces alces</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017
Alpacas	<i>Vicugna pacos</i>	BTV, EHDV	A, V	Schulz <i>et al.</i> , 2012; Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Rivera <i>et al.</i> , 2021; Spickler, 2019
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	BTV	A	May-Júnior, 2011
Anta-malaia	<i>Tapirus indicus</i>	BTV	A	Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Antilocapra	<i>Antilocapra americana</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Rivera <i>et al.</i> , 2021; Spickler, 2019; Smith <i>et al.</i> , 2017
Antílope negro	<i>Hippotragus niger</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017
Antílope-negro	<i>Antilope cervicapra</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Rivera <i>et al.</i> , 2021
Bantengue	<i>Bos javanicus</i>	BTV	A	Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Bisão americano	<i>Bison bison</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; Niedbalski <i>et al.</i> , 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Rivera <i>et al.</i> , 2021; Spickler, 2019; Nol <i>et al.</i> , 2010; Savini <i>et al.</i> , 2011
Bisão-europeu	<i>Bison bonasus</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017
Blesbok	<i>Damaliscus albifrons</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017; House <i>et al.</i> , 1982
Boi-almiscarado	<i>Ovibos moschatus</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017
Bongo	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	BTV	A, V	House <i>et al.</i> , 1982; Rivera <i>et al.</i> , 2021; Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Búfalo-africano	<i>Syncerus caffer</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Hamblin <i>et al.</i> , 1990

Continuação Quadro 2.

Búfalo-asiático	<i>Bubalus bubalis</i>	BTV, EHDV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017; Spickler, 2019
Cabra montesa	<i>Oreamnos americanus</i>	BTV	A	Rivera et al., 2021
Cachorro	<i>Canis lupus familiaris</i>	BTV	A, V	Wilbur et al., 1994; Evermann, 2008
Caititu	<i>Pecari tajacu</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017; Gerber et al., 2012; Rivera et al., 2013
Camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	BTV	A, V	Batten et al, 2011; Spickler, 2015; More et al., 2017
Cão-selvagem-africano	<i>Lycaon pictus</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017; Alexander et al., 1994
Carneiro-da-barbária	<i>Ammotragus lervia</i>	BTV	A	Caballero-Gómez et al, 2021
Carneiro-de-dall	<i>Ovis dalli</i>	EHDV	A	Rivera et al., 2021
Carneiro-selvagem	<i>Ovis canadensis</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; More et al., 2017; Rivera et al., 2021; Spickler, 2019
Cervo almiscarado siberiano	<i>Moschus moschiferus</i>	BTV	A	More et al., 2017
Cervo Sika	<i>Cervus nippon</i>	BTV, EHDV	A	More et al., 2017; Rivera et al., 2021
Cervo-canadense	<i>Cervus canadensis</i>	BTV, EHDV	A, V	More et al., 2017; Rivera et al., 2021
Cervo-dama	<i>Dama dama</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; More et al., 2017; Rivera et al., 2021; Spickler, 2019; Savini et al., 2011
Cervo-do-padre-david	<i>Elaphurus davidianus</i>	EHDV	A	Rivera et al., 2021
Cervo-do-pantanal	<i>Blastocercus dichotomus</i>	BTV, EHDV	A, V	Pandolfi et al., 1998; Spickler, 2019; Kawanami et al., 2018
Cervo-nobre	<i>Cervus elaphus</i>	BTV, EHDV	A, V	Niedbalski et al., 2015; More et al., 2017; Rivera et al., 2021; Spickler, 2019; Nol et al., 2010; Caballero- Gómez et al, 2021
Cervo-rusa	<i>Cervus timorensis rusa</i>	EHDV	A	Spickler, 2019
Chacal	<i>Canis mesomelas</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017; Alexander et al., 1994
Chital	<i>Axis axis</i>	BTV, EHDV	A	More et al., 2017; Rivera et al., 2021
Chitas	<i>Acinonyx jubatus</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017
Cobo-de-meia-lua	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	BTV	A	Hamblin et al., 1990
Corça	<i>Capreolus capreolus</i>	BTV, EHDV	A	More et al., 2017; Spickler, 2019; Savini et al., 2011
Dik-dik	<i>Madoqua phillipsi</i>	BTV	A	House et al., 1982
Dromedário	<i>Camelus dromedarius</i>	BTV	A, V	Niedbalski et al., 2015; More et al., 2017
Duiker de flanco vermelho	<i>Cephalophus rufilatus</i>	BTV	A	House et al., 1982
Duiker de Maxwell	<i>Cephalophus maxwelli</i>	BTV	A	House et al., 1982
Duiker preto	<i>Cephalophus niger</i>	BTV	A	House et al., 1982

Continuação Quadro 2.

Duiker Zebra	<i>Cephalophus zebra</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982
Elande	<i>Taurotragus oryx</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017; House <i>et al.</i> , 1982
Elefante africano	<i>Loxodonta africana</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Elefante-asiático	<i>Elephas maximus</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017; Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Fossa	<i>Cryptoprocta ferox</i>	BTV	A	Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Ganeta-de-malha-ruiva	<i>Genetta maculata</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Alexander <i>et al.</i> , 1994
Gazela dama	<i>Nanger dama</i>	EHDV	A	Rivera <i>et al.</i> , 2021
Gazela de cauda preta	<i>Goitred Gazella</i>	BTV	A	Gür, 2008
Gazela de Thomson	<i>Gazella thomsonii</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982; Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Gazela-persa	<i>Gazella subgutturosa subgutturosa</i>	EHDV	A	Spickler, 2019
Gerenuk	<i>Litocranius walleri</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982; Rivera <i>et al.</i> , 2021
Girafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017
Girafa-reticulada	<i>Giraffa reticulata</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982
Gnu-de-cauda-branca	<i>Connochaetes gnou</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; House <i>et al.</i> , 1982
Gnu-de-cauda-preta	<i>Connochaetes taurinus</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Hamblin <i>et al.</i> , 1990; House <i>et al.</i> , 1982
Harnessed bushbuck	<i>Tragelaphus scriptus</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982
Hartebeest	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017
Hiena-malhada	<i>Crocuta crocuta</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Alexander <i>et al.</i> , 1994
Hirola	<i>Beatragus hunteri</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982
laque	<i>Bos grunniens</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Mauroy <i>et al.</i> , 2008; Spickler, 2019; Rivera <i>et al.</i> , 2021
Íbex	<i>Capra ibex</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017
Íbex ibérico	<i>Capra pyrenaica</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017; Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Íbex-da-Núbia	<i>Capra nubiana</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017
Íbex-siberiano	<i>Capra sibirica</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017
Impala	<i>Aepyceros melampus</i>	BTV	A	More <i>et al.</i> , 2017; Hamblin <i>et al.</i> , 1990; Caballero-Gómez <i>et al.</i> , 2021
Klipspringer	<i>Oreotragus oreotragus</i>	BTV	A	House <i>et al.</i> , 1982
Kongoni	<i>Alcelaphus coke</i>	BTV	A	Hamblin <i>et al.</i> , 1990
korrigum	<i>Damaliscus lunatus</i>	BTV	A	Hamblin <i>et al.</i> , 1990
Kudo grande	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017
Kudu menor	<i>Tragelaphus imberbis</i>	BTV, EHDV	A	House <i>et al.</i> , 1982; Rivera <i>et al.</i> , 2021
Leão	<i>Panthera leo</i>	BTV	A	Spickler, 2015; More <i>et al.</i> , 2017; Alexander <i>et al.</i> , 1994

Continuação Quadro 2.

Leão-marinho-da-patagônia	<i>Otaria byronia</i>	BTV	A	Caballero-Gómez et al, 2021
Leopardo	<i>Panthera pardus</i>	BTV	A	Caballero-Gómez et al, 2021
Lhama	<i>Lama glama</i>	BTV, EHDV	A, V	Schulz et al., 2012; Spickler, 2015; More et al., 2017; Attoui et al., 2016
Lince	<i>Lynx lynx</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; Jauniaux et al., 2008; More et al., 2017; Caballero-Gómez et al, 2021
Lobo-ibérico	<i>Canis lupus signatus</i>	BTV	A	Caballero-Gómez et al, 2021
Muflão	<i>Ovis orientalis</i>	BTV	A	More et al., 2017
Muflão europeu	<i>Ovis aries musimon</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; Savini et al., 2011; Caballero-Gómez et al, 2021
Muntjac indiano	<i>Muntiacus muntjac</i>	EHDV	A	Spickler, 2019; Savini et al., 2011
Muntjac chinês	<i>Muntiacus reevesi</i>	BTV	A, V	Spickler, 2015; More et al., 2017
Nyala	<i>Tragelaphus angasi</i>	BTV	A	House et al., 1982
Ocapi	<i>Okapia johnstoni</i>	BTV	A	More et al., 2017
Onça-pintada	<i>Panthera onca</i>	BTV	A	Caballero-Gómez et al, 2021
Órix	<i>Oryx gazella</i>	BTV	A	House et al., 1982
Órix-da-arábia	<i>Oryx leucoryx</i>	BTV, EHDV	A	More et al., 2017; House et al., 1982; Spickler, 2019
<i>Otomys irroratus</i>	<i>Otomys irroratus</i>	BTV	A	More et al., 2017
Palanca-vermelha	<i>Hippotragus equinus</i>	EHDV	A	Rivera et al., 2021
Pantera da flórida	<i>Puma concolor coryi</i>	BTV, EHDV	A	More et al., 2017; Dunbar, Cunningham e Roof, 1998
Rato de grama listrado	<i>Rhabdomys pumilio</i>	BTV	A	More et al., 2017
Rinoceronte-branco	<i>Ceratotherium simum</i>	BTV, EHDV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017; Spickler, 2019
Rinoceronte-negro	<i>Diceros bicornis</i>	BTV, EHDV	A	Spickler, 2015; More et al., 2017; Spickler, 2019
Springbok	<i>Antidorcas marsupialis</i>	BTV	A	More et al., 2017; House et al., 1982
Urso Negro	<i>Ursus americanus</i>	BTV, EHDV	A	More et al., 2017; Dunbar, Cunningham e Roof, 1998; Spickler, 2019
Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2019; Baldini et al., 2018; Pinheiro, 2019
Veado-catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2019; Favero et al., 2013; Kawanami et al., 2018
Veado-de-cauda-branca	<i>Odocoileus virginianus</i>	BTV, EHDV	A, V	Spickler, 2015; Niedbalski et al., 2015; More et al., 2017; Rivera et al., 2021; Spickler, 2019; Nol et al., 2010
Veado-de-cauda-preta	<i>Odocoileus hemionus</i>	BTV, EHDV	A, V	Niedbalski et al., 2015; More et al., 2017; Rivera et al., 2021; Spickler, 2019
Veado-mateiro	<i>Mazama americana</i>	BTV	A, V	More et al., 2017; Kawanami et al., 2018

### 3.3.5. Epidemiologia em animais selvagens do Brasil:

Animais selvagens tanto de vida livre quanto de cativeiro, em especial animais presentes em jardins zoológicos, se mostraram susceptíveis para infecções de *Orbivirus* (Nol *et al.*, 2010; Favero *et al.*, 2013; EFSA, 2017; Caballero-Gómez *et al.*, 2021). Além disto, estudos em animais selvagens em cativeiro são considerados extremamente importantes para a vigilância de patógenos, especialmente os transmitidos por vetores, devido à grande variedade de espécies e a facilidade de acesso a amostras durante exames de rotina e manejo dos animais (Nol *et al.*, 2010; Favero *et al.*, 2013; Caballero-Gómez *et al.*, 2021).

Estudos anteriores relataram BTV e EHDV circulando em jardins zoológicos de diferentes partes do mundo, além de ter sido demonstrado que diversas espécies, presentes nestes ambientes, podem desenvolver doença clínica, incluindo várias espécies ameaçadas. Porém, a epidemiologia destas doenças em animais selvagens em cativeiro é pouco conhecida (Pandolfi, 1999; Frölich *et al.*, 2005; Mauroy *et al.*, 2008; Nol *et al.*, 2010; Sanderson *et al.*, 2010; Baldini *et al.*, 2018; Morikawa *et al.*, 2018; Sanchez-Romano *et al.*, 2019; Caballero-Gómez *et al.*, 2021).

Surtos de BTV e EHDV afetando cervídeos foram descritos em centros de conservação, zoológicos e mantenedores de fauna silvestre do Brasil (Duarte & Arita, 1992; Morato *et al.*, 1993; Kawanami *et al.*, 2012; Favero *et al.*, 2013; Baldini, 2016; Kawanami *et al.*, 2017; Baldini *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018). A maioria dos estudos destes vírus envolvendo animais selvagens na América do Sul utilizam testes sorológicos (Pandolfi *et al.* 1999; Morikawa *et al.*, 2018). Em estudos com amostras de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de vida livre no estado de São Paulo foi identificado uma alta soropositividade para BTV e EHDV (Pandolfi *et al.* 1999; Montassier *et al.*, 2001). Em dois outros estudos, um com amostras de catetos (*Pecari tajacu*) e outro com antas (*Tapirus terrestris*) no mesmo estado, foram identificados alguns animais com anticorpos para BTV (May-Júnior 2011; Gerber *et al.* 2012). Pesquisas no mesmo estado, utilizando amostras de órgãos em parafina de cervos-do-pantanal e veados-mateiros, identificaram alguns animais positivos para BTV em testes moleculares. Estes animais apresentavam alguns sinais clínicos e histopatológicos característicos de infecções por doenças hemorrágicas como edema de face e lesões ulcerativas na boca, língua e estômagos (Kawanami *et al.*, 2012; Kawanami *et al.*, 2017; Kawanami *et al.* 2018). Em 2008, o EHDV-2 foi isolado de um veado-bororó (*Mazama nana*) no Zoológico de Pomelore, Santa Catarina (Favero *et al.* 2013).

Em estudos no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), no Paraná, foram identificados sete sorotipos de BTV (BTV-3, 12, 14, 18, 19, 22 e 24) e dois de EHDV (EHDV-1 e 2) isolados de veados-bororó e cervos-do Pantanal, que causaram diversos surtos nos cervídeos desta região durante 15 anos. Uma preocupação foi a falta de anticorpos entre vários dos animais testados, gerando a suspeita de que os animais acometidos apresentam um quadro agudo de forma que vieram a óbito antes de desenvolverem resposta imune (Favero *et al.*, 2013; Baldini, 2016; Baldini *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018).

No Brasil existem nove espécies de cervídeos: Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), Veado-bororó (*Mazama nana*), Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), Veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*), Veado-galheiro (*Odocoileus virginianus*), Veado-mateiro (*Mazama americana*, *Mazama rufia*), Veado-mateiro-pequeno (*Mazama juncunda*) e Veado-roxo (*Mazama nemorivaga*). Destas, três espécies, *B. dichotomus*, *M. nana* e *M. juncunda*, são consideradas ameaçadas de extinção estando presentes na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN). Cada espécie possui uma preferência por diferentes áreas, mas é possível encontrar espécies de cervídeos por todo o Brasil. O Cervo-do-pantanal é encontrado no Pantanal e áreas de várzeas e é o maior cervídeo da América do Sul. O Veado-bororó encontrado em áreas da Mata Atlântica, principalmente em locais com vegetação mais densa e tem porte pequeno, sendo a menor espécie do gênero *Mazama*. O Veado-campeiro é encontrado em áreas de campos do Pantanal, Cerrado e Pampas e possui porte médio. Veado-catingueiro é o mais abundante da região neotropical tendo plasticidade ecológica, sendo encontrado na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, além de haver relatos desta espécie em regiões de agricultura e pecuária próximas às áreas naturais remanescentes e possui porte pequeno a médio. O Veado-galheiro é comum no hemisfério norte, sendo encontrado nos estados do norte do Brasil, ocupa diferentes ambientes, evitando áreas de floresta densa, ocorrendo em locais com árvores esparsas e possui porte médio. A espécie *M. americana* é considerada um complexo de espécies com grande semelhança morfológica, desta forma o *M. rufia* está incluso neste grupo de espécies. Este grupo de cervídeos pode ser encontrado em florestas tropicais e sub-tropicais da América do Sul, principalmente florestas com mata densa e são as maiores espécies do gênero *Mazama*. O Veado-mateiro-pequeno é

encontrado em áreas da Mata Atlântica e possui porte intermediário, sendo o maior mamífero endêmico da Mata Atlântica. E o Veado-roxo é encontrado na Floresta Amazônica, região central da Mata Atlântica e partes do cerrado e tem porte médio (Azevedo, Oliveira & Duarte, 2021; Duarte *et al.*, 2015; Duarte *et al.*, 2016; Lizcano & Alvarez, 2016).

Diversos estudos em cervídeos brasileiros demonstraram que o BTV e o EHDV podem infectar e causar doenças hemorrágicas nestes animais, sendo consideradas grandes problemas na conservação de cervídeos brasileiros tanto de cativeiro quanto de vida livre (Pandolfi, 1999; Montassier *et al.*, 2001; Favero *et al.*, 2013; Lobato *et al.*, 2015; Kawanami, 2016; Baldini *et al.*, 2018; Kawanami *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2018).

### 3.3.6. BTV e EHDV em Zoológicos

Foram realizados estudos sorológicos de BTV e EHDV em animais de zoológico. Um dos primeiros relatos é a análise de anticorpos contra BTV de animais que foram importados do Quênia e da África do Sul para zoológicos dos EUA. Os soros coletados foram submetidos ao teste de IDGA. Foram testados 345 animais selvagens de 30 espécies diferentes pertencentes às famílias Cervidae, Bovidae, Camelidae, Giraffidae e Elephantidae. Este estudo constatou que 24 espécies diferentes possuíam anticorpos contra BTV, tendo identificado 13 novas espécies com soropositividade para este vírus, sendo a primeira identificação em membros da família Giraffidae. O estudo avalia que a identificação deste vírus em animais africanos é esperada por este vírus ser endêmico no continente africano e pelo clima dos países que os animais foram importados serem propícios para a transmissão de BTV. Além disso, a não identificação das novas espécies soropositivas antes pode ser devido à falta de testagem de animais selvagens. Vinte oito dos soros positivos foram submetidos à SN sendo utilizados 20 sorotipos de BTV. A maioria dos sorotipos identificados são exóticos nos EUA. Tal estudo é extremamente importante pois a importação de animais selvagens pode levar a introdução de sorotipos exóticos que podem resultar em surtos (House *et al.*, 1982).

Em setembro de 2007 em um zoológico da Bélgica dois lincos-euroasiáticos (*Lynx lynx*) vieram a óbito com sinais de doença hemorrágica e utilizando qRT-PCR e isolamento viral foi identificado que estes animais foram infectados pelo BTV-8. A principal suspeita é que eles foram alimentados com fetos bovinos e recém-nascidos infectados com BTV-8 (Jauniaux *et al.*, 2008).

No Brasil em 2008 no Zoológico de Pomerode, Santa Catarina, um veado-Catingueiro, fêmea de 2 anos, e um veado-bororó, de 1 ano, vieram a óbito com sinais de doença hemorrágica. Foi identificado o vírus como EHDV-2. Este vírus pode causar surtos em cervídeos e o veado-bororó é uma espécie ameaçada, desta forma levantando a importância de criar mecanismos de controle e prevenção de EHDV e BTV (Favero *et al.*, 2013).

Amostras de soro de 241 animais de 71 espécies de cinco zoológicos urbanos diferentes da Espanha foram coletadas entre 2007 e 2019. As amostras foram testadas utilizando ELISA para BTV e alguns dos soros positivos foram testados por SN para BTV-1 e BTV-4. Quarenta e seis animais, 19,1%, foram soropositivos para BTV no teste de ELISA, das 71 espécies testadas 18 apresentaram anticorpos anti-BTV, variando a proporção de animais e espécies positivas dentro de cada grupo. E animais soropositivos foram encontrados todos os anos da coleta. Trinta e nove dos quarenta e seis animais positivos foram submetidos à SN e destes 25 apresentaram anticorpos contra BTV-1, 5 contra BTV-4 e 3 animais apresentaram anticorpos contra ambos os sorotipos. Assim demonstrando uma possível circulação de BTV nos zoológicos estudados (Caballero-Gómez *et al.*, 2021).

Em outro estudo foram coletadas amostras de soro de 17 carneiros-da-barbária (*Ammotragus lervia*), machos e fêmeas de diferentes idades, mantidos em cativeiro no Zoológico de Curitiba, Brasil para serem testadas para BTV, artrite encefalite caprina (CAE) e Maedi-visna (MV) utilizando IDGA e ELISA. Sete dos animais, 41,2%, foram positivos para BTV e nenhum animal foi positivo para CAE e MV. Alguns animais soropositivos do estudo nasceram no zoológico, desta forma demonstrando a circulação de BTV neste ambiente e devido à ausência de sinais clínicos nestes animais é possível que esta espécie possa contribuir na transmissão (Morikawa *et al.*, 2018).

Também foram realizados estudos dos vetores de BTV e EHDV em zoológicos. Um deles foi realizado no Jardim Zoológico Nacional da África do Sul, entre os anos de 2002 e 2004, em que estes insetos foram capturados utilizando armadilhas de sucção com luz negra colocadas em quatro locais diferentes uma vez por semana. As espécies de *Culicoides* coletadas foram

identificadas pelo padrão de asas. Foram obtidos um total de 478.040 *Culicoides* de 33 espécies diferentes. E foi relatado que a armadilha próxima ao elefante teve o maior número de insetos coletados, representando 28 espécies diferentes. A espécie mais coletada foi *C. imicola*, sendo mais identificada nas armadilhas próximas aos grandes animais. Já na armadilha próxima às aves esta espécie foi pouco identificada. As proporções das espécies coletadas neste estudo concordam com estudos prévios de captura de *Culicoides* realizados em fazendas da mesma região (Labuschagne *et al.*, 2007).

Em 2007, no Zoológico de Greenville e no Zoológico de Riverbanks, na Carolina do Sul, EUA, foram feitas capturas de *Culicoides* de maio a agosto, utilizando dois tipos de armadilhas, armadilhas de sucção com luz incandescente e com luz ultravioleta, com atrativo (CO<sub>2</sub> produzido por gelo seco). Duas armadilhas de cada tipo foram utilizadas no Zoológico de Greenville e três no Zoológico de Riverbanks. Ao todo foram coletadas 16 espécies de *Culicoides*, sendo 10 espécies encontradas no Zoológico de Greenville e 12 espécies no Zoológico de Riverbanks. Seis espécies foram encontradas em ambos zoológicos: *C. guttipennis*, *C. obsoletus*, *C. paraensis*, *C. sanguisuga*, *C. scanloni*, e *C. stellifer*. No Zoológico de Greenville foram coletados 101 insetos, sendo que 90% destes foram *C. guttipennis* e *C. obsoletus*. Já no Zoológico de Riverbanks foram coletados 88 *Culicoides*, destes 81% pertenciam a 4 espécies: *C. sanguisuga*, *C. mulrenanni* Beck, *C. stellifer*, e *C. guttipennis*. As armadilhas que utilizaram luz ultravioleta capturaram cerca de 80% dos *Culicoides*, desta forma o uso destas é preferível em comparação com as armadilhas com luz incandescente. A altura das armadilhas também foi um fator crucial para a captura, sendo importante avaliar qual a altura que a espécie de *Culicoides* a ser estudada costuma se alimentar dos hospedeiros. Várias das espécies coletadas já foram associadas com a transmissão de patógenos (Nelder *et al.*, 2010).

Em 2008 no zoológico de Chester, nordeste da Inglaterra, foi realizada a captura de *Culicoides* em cinco locais utilizando armadilhas de sucção com luz negra (modelo Onderstepoort). As armadilhas foram colocadas por quatro noites seguidas, de 25 a 29 de junho. As espécies foram identificadas por aspectos morfológicos. Foram capturados um total de 35.401 *Culicoides*, sendo 97,5% fêmeas e destes 96,6% pertenciam ao grupo *Obsoletus* que no reino unido é composto por quatro espécies *C. obsoletus sensu stricto*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* e *C. chiopterus* que não são facilmente diferenciáveis somente por características morfológicas e podem transmitir BTV. Também foram capturados machos do grupo *Obsoletus*, identificados como *C. obsoletus sensu stricto* e *C. scoticus*. Ao todo foram identificadas 25 espécies. A grande densidade de *Culicoides* capturados representa um alto risco para a transmissão de BTV (Vilar *et al.*, 2011).

Foi realizado coleta de insetos no Zoológico Sunset (SSZ), Manhattan, Kansas, EUA, entre março e outubro de 2015, utilizando armadilhas de sucção com luz ultravioleta modelo CDC e armadilha utilizando bioagentes para atrair os insetos (BG-S). Foram colocadas armadilhas em oito locais, sendo realizada a coleta na última semana de cada mês durante três dias consecutivos. Foram coletados 8.401 *Culicoides*, 2.260 com a armadilha BG-S e 6.141 com a CDC. As espécies de insetos foram identificadas por análises morfológicas. Foram coletadas 21 espécies de *Culicoides*, sendo três destas *C. ousairani*, *C. brookmani* e *C. denningi*, novas identificações neste Estado. Também foram coletadas sete espécies de Simuliidae, duas espécies de Muscidae, dois Tabanideos e uma espécie de Psychodidae. A maioria dos insetos, em especial os *Culicoides*, foram coletados na armadilha com luz ultravioleta (Swanson *et al.*, 2018).

Entre junho de 2014 e junho de 2015, foram realizadas coletas de *Culicoides* em dois zoológicos da Inglaterra, ZSL London, localizado em uma área mais urbana, e ZSL Whipsnade Zoo, localizado em uma área mais rural. Foram colocadas armadilhas de sucção com luz negra (modelo Onderstepoort) em cinco locais em cada zoológico e as capturas foram realizadas uma vez por semana. As espécies de *Culicoides* coletadas eram identificadas por análise morfológica do padrão das asas, as fêmeas eram também identificadas pelo estágio gonadotrófico entre não pigmentada ou nulípara, ingurgitada, gravídica e pigmentada ou parida. Os *Culicoides* ingurgitados foram posteriormente utilizados para a identificação de preferência alimentar por meio da extração e sequenciamento do material genético presente no sangue do abdome destes insetos, foi sequenciado a região do citocromo C oxidase subunidade 1 (Cox 1), marcador mitocondrial. Foram coletados 11.648 *Culicoides*, 5.880 do ZSL Whipsnade Zoo e 5.768 do ZSL London. Foram identificadas 20 espécies no ZSL London e 18 no ZSL Whipsnade Zoo, 13 delas encontradas em ambos os zoológicos e a maioria das espécies coletadas são de possíveis transmissores de BTV. No ZSL London a armadilha mais próxima do camelo (*Camelus bactrianus*) foi a com maior número de capturas e no ZSL Whipsnade Zoo a armadilha próxima ao elefante foi a com mais capturas. Entre novembro de 2014 e abril de 2015 não foi coletado nenhum inseto, sendo denominada como temporada sem vetores. Dos *Culicoides* coletados, 71

deles estavam ingurgitados, 0,61%, destes somente três não foram processados para análise de preferência alimentar. Após o sequenciamento foi possível ter resultado para 31, 46%, dos ingurgitados processados. Vinte e quatro das sequências alinharam com mamíferos e sete alinharam com aves, sendo identificadas 13 espécies diferentes. Cada espécie de *Culicoides* demonstrou uma preferência diferente, como por exemplo foi identificado *C. obsoletus* se alimentando de elefantes asiáticos, alpaca ou lhama, camelo e cavalo de Przewalski (*Equus przewalskii*), já o *C. achrayi* se alimentou principalmente de aves da Inglaterra. Durante a coleta foi notada a variação das capturas de acordo com a temperatura e clima (England *et al.*, 2020).

Até o presente estudo não foram realizados levantamentos das espécies de *Culicoides* presentes em jardins zoológicos no Brasil. Desta forma não sendo possível avaliar se existe a presença dos vetores de BTV e EHDV nestes locais.

### 3.3.7. Patogenia

A patogenia de BTV e EHDV é similar em ruminantes domésticos e silvestres, existindo diferenças na severidade e sinais clínicos entre as espécies. A maioria dos animais infectados são assintomáticos ou com sinais leves. A doença clínica ocorre normalmente quando animais suscetíveis são levados a regiões enzoóticas ou sorotipos novos são introduzidos em regiões que estes vírus já circulam. Assim, a ocorrência de BT e EHD resulta da interação entre hospedeiros, sorotipos virais, vetores e ambiente (Pini, 1976; Barratt-Boyes and Maclachlan, 1994; Darpel *et al.*, 2009; Maclachlan *et al.*, 2009; Maclachlan *et al.*, 2019).

O BTV e o EHDV são introduzidos no hospedeiro susceptível por via cutânea pela picada de fêmeas de *Culicoides* infectados. Então, o vírus é transportado pelas células dendríticas e macrófagos da pele até os linfonodos regionais, onde realiza a replicação inicial que dura de dois a três dias. Também ocorre multiplicação nas células endoteliais do local da inoculação viral. O vírus é carregado por eritrócitos, leucócitos e plaquetas para outras partes do corpo pela circulação sanguínea e linfática, em que ocorre replicação principalmente em órgãos do sistema linfático (linfonodos, baço, timo e medula óssea), pulmões e células endoteliais dos vasos sanguíneos de diferentes órgãos, assim causando um segundo pico de viremia, que pode levar cerca de 20 dias. No início da viremia, o vírus se associa às células sanguíneas, tanto como plaquetas quanto a eritrócitos, mas em estágios mais avançados da doença se torna associado somente com eritrócitos, devido ao curto período de vida das plaquetas. Partículas virais se ligam à glicoforinas na superfície dos eritrócitos permanecendo em invaginações na membrana dessas células, permitindo uma viremia prolongada na presença de anticorpos neutralizantes e permitindo a infecção de vetores. A lise das células endoteliais e eritrócitos infectados leva a lesões nos vasos e conseqüentemente sinais relacionados à doença hemorrágica (Pini, 1976; Ellis *et al.*, 1993; Barratt-Boyes and Maclachlan, 1994; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008; Darpel *et al.*, 2009; Hemati *et al.*, 2009; Maclachlan *et al.*, 2009; Sanchez-Cordon *et al.*, 2010; Howerth, 2015; MacLachlan *et al.*, 2015; Alfieri *et al.*, 2017; Belbis *et al.*, 2017; Roy, 2017).

Os determinantes da virulência destes vírus são pouco definidos, apesar de existirem diferenças claras entre sorotipos (Elbers *et al.*, 2008; Conraths *et al.*, 2009; Maclachlan *et al.*, 2009; Ruder *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2018; Maclachlan *et al.*, 2019). Também podem existir diferenças de virulência entre linhagens virais do mesmo sorotipo devido à mutações e recombinações entre vírus que coinfectam o mesmo hospedeiro (Oberst *et al.*, 1987; Maclachlan *et al.*, 2009). A espécie do hospedeiro também influencia muito na virulência (Elbers *et al.*, 2008; Conraths *et al.*, 2009; Maclachlan *et al.*, 2009; Ruder *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2018; Maclachlan *et al.*, 2019). Além disto, estado imune, idade e estresse ambiental, como variação nas temperaturas, também influenciam a severidade destas doenças (Verwoerd & Erasmus, 2004; Maclachlan *et al.*, 2009).

A viremia de BTV em ovinos e cervídeos costuma ser de 14 a 54 dias. Já a de EHDV pode chegar até a 60 dias. Essas espécies costumam apresentar vários sinais clínicos em ambas as doenças. Já nos bovinos, ambos os vírus podem causar viremias longas de 60 até 100 dias, mas com pouco ou nenhum sinal clínico, assim tornando estes animais importantes na epidemiologia destas doenças (Koumbati *et al.*, 1999; Howerth, 2015; Alfieri *et al.*, 2017). A diferença na viremia se dá pela longevidade dos eritrócitos de cada espécie (MacLachlan *et al.*, 2009).

A infecção por BTV e EHDV resulta na morte celular principalmente de células endoteliais por apoptose durante a liberação de partículas virais. Além disto, a replicação viral em células mononucleares e endoteliais estimulam a liberação de mediadores inflamatórios, como interleucinas (IL-1, IL-8, IL-6), interferon (IFN-I), prostaglandina F2-alfa e tromboxano, e

mediadores vasoativos, como o óxido nítrico, levando à respostas de fase inflamatória exacerbada, vasodilatação, agregação plaquetária e aumento na permeabilidade vascular, resultando em febre, hiperemia, edema, trombozes, infartos teciduais e síndromes hemorrágicas (Quist *et al.* 1997; Foster *et al.* 1991; DeMaula *et al.*, 2001; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008; MacLachlan *et al.*, 2009; Howerth, 2015;). Porém, mesmo ocorrendo a produção de anticorpos de 7 a 14 dias após a infecção, o vírus continua presente protegido na membrana dos eritrócitos. Estes anticorpos neutralizantes, principalmente contra a VP2 e em menor quantidade contra a VP5, protegem contra uma futura reinfecção de vírus do mesmo sorotipo, além de diminuir a possibilidade de transmissão para os vetores. O soro de animais infectados também possui anticorpos induzidos pela VP7, que são específicos para o sorogrupo, e por outras proteínas estruturais e não estruturais. Além disto, a resposta imune celular tem um papel fundamental na redução da disseminação dos vírus no organismo, mesmo que não consiga eliminar os vírus completamente, os linfócitos TCD8+, por seu efeito citotóxico nas células infectadas, apresenta um papel crucial no combate a infecção (Lobato *et al.*, 1997; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008; MacLachlan *et al.*, 2009; Sperlova & Zendulkova, 2011; Alfieri *et al.*, 2017).

### 3.3.8. Sinais clínicos

O BT e o EHD causam hemorragias sistêmicas, trombozes, infartos teciduais e coagulação intravascular disseminada devido a injúrias no endotélio vascular. Os sinais clínicos podem variar entre as diferentes espécies, assim como dentro da mesma espécie determinada pelo sorotipo infectante e pelo estado imune dos hospedeiros. Desta forma, os animais podem ter quadros subclínicos, superagudos, agudos, crônicos e morte súbita. (Pini, 1976; Fischer *et al.*, 1995; Verwoerd and Erasmus, 2004; Darpel *et al.*, 2009; Savini *et al.*, 2011; Howerth *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Belbis, 2017; Spickler, 2019).

Em ovinos, essas doenças costumam se manifestar na forma aguda, crônica ou subclínica. Estes animais podem apresentar febre, apatia, taquipneia, hiperemia dos lábios e nariz, descarga nasal que pode ser mucopurulenta ou sanguinolenta, edema e úlceras no trato gastrointestinal superior, dispneia, diarreia e vômitos hemorrágicos, pneumonia por aspiração e coagulopatias. Em casos raros, pode ser observada língua cianótica. Em estágios mais avançados da doença pode ocorrer dermatites, coronites, laminites, hiperemia da banda coronária, torcicolos, paresia e necrose dos músculos estriados, sendo possível identificar animais com as costas arqueadas e relutantes em se mover. Em ovelhas prenhas, podem ocorrer abortos, mumificações fetais e nascimentos de filhotes fracos com possíveis defeitos congênitos (Osburn, 1994; Stallknecht and Howerth, 2004; Elbers *et al.*, 2008; MacLachlan *et al.*, 2008; Darpel *et al.*, 2009; MacLachlan *et al.*, 2009; Saegerman *et al.*, 2011; Sperlova & Zendulkova, 2011). A infecção endotelial por BTV é relativamente curta nos tecidos de ovelhas afetadas, durando cerca de 10 dias após a infecção, em comparação com a morte que pode ocorrer em até 2 semanas após a infecção (Verwoerd and Erasmus, 2004; MacLachlan *et al.*, 2008; Darpel *et al.*, 2009).

Caprinos apresentam poucos sinais clínicos por infecções destas doenças, sendo eles similares aos de ovinos só que em uma menor severidade. Alguns sinais identificados em surtos passados foram redução da produção de leite, febre, edema da face, descargas nasais, eritema do úbere e lesões hemorrágicas subcutâneas (Dercksen *et al.*, 2007; Sperlova & Zendulkova, 2011).

Bovinos não costumam apresentar sinais clínicos nas infecções por EHDV e BTV, existindo exceções como o BTV-8 que circula na Europa e o EHDV-2 anteriormente denominado como vírus de Ibaraki, que podem causar severos sinais clínicos como febre, anorexia, dificuldade de deglutir, úlceras e erosões na cavidade oral, nasal e trato digestório, sialorreia, edemas, hiperemia, conjuntivite, laminites, dermatites ulcerativas, coronites, problemas reprodutivos, edema pulmonar e em alguns casos pode levar alguns animais a morte. Infecções em vacas prenhas podem resultar em reabsorção fetal, aborto e nascimento de bezerras fracas e com má formações fetais, principalmente hidrocefalia (Uchinuno *et al.*, 2003; Elbers *et al.*, 2008; Conrath *et al.*, 2009; MacLachlan *et al.*, 2009; Sperlova & Zendulkova, 2011).

Cervídeos infectados por BTV e EHDV, podem apresentar quadros superagudos, com morte dentro de 36 horas, até cursos crônicos com animais doentes por várias semanas. Estes animais costumam desenvolver coagulação intravascular disseminada devido a danos vasculares causados pela infecção destes vírus, o que leva à ocorrência de diátese hemorrágica. Além disto, podem ter febre, anorexia, fraqueza, diarreia sanguinolenta, hematúria, cianose na língua, claudicação, edema na cabeça e pescoço, úlceras e erosões na cavidade oral, desidratação, sialorréia, descarga nasal que pode ser sanguinolenta, hemorragias por todo corpo, choque

hipovolêmico e morte. A maioria destes sinais foram identificados em estudos com cervos-de-cauda-branca e veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*). Outras espécies de cervídeos se mostraram resistentes à doença clínica por estes vírus, como o veado-de-cauda-preta (*Odocoileus hemionus columbianus*) e o cervo-nobre (*Cervus elaphus*) (Work *et al.* 1992; Stallknecht and Howerth, 2004; Maclachlan *et al.*, 2008; López-Olivera *et al.* 2010; Nol *et al.* 2010; Favero *et al.*, 2013; Lobato *et al.*, 2015; Bianchi *et al.*, 2017; OIE, 2018).

Vários ruminantes selvagens de vida livre e de cativeiro desenvolveram doença hemorrágica durante o surto de BTV na Europa causado pelo sorotipo 1, como bois-almiscarados, bisões americanos e europeus e iaques. Ruminantes africanos parecem ser resistentes à doença clínica causada pela infecção deste sorotipo (Fernandez-Pacheco *et al.*, 2008; Mauroy *et al.*, 2008). Antilocabras também são susceptíveis e podem vir a óbito por infecções por BTV como demonstrado em um surto prévio nos Estados Unidos (EUA) em que animais foram observados com hemorragia e edema na aorta e artéria pulmonar, hemorragias no trato gastrointestinal, linfonodos, bexiga e nas superfícies sinoviais das cápsulas articulares (Thorne *et al.* 1988).

Infecções experimentais de camélídeos (lhamas, alpacas e camelos) demonstraram que estes animais são resistentes ao desenvolvimento de sinais clínicos (Batten *et al.* 2011; Schulz *et al.* 2012). Mas, foi descrito que os camelos podem ser reservatórios para BTV por já ter sido demonstrado que, mesmo não apresentando sinais, é possível que o vírus se multiplique e seja isolado de camelos infectados (Batten *et al.* 2011). Apesar deste relato, já foram descritos casos em lhamas vindo a óbito por infecções de BTV. Estes animais apresentaram edema pulmonar, hidrotórax e efusão pericárdica (Meyer *et al.*, 2009). Também houve descrição de uma alpaca que veio a óbito por infecção por BTV com sinais semelhantes aos descritos nas lhamas (Ortega *et al.* 2010).

Doença causada por BTV em ovinos selvagens, muflão (*Ovis aries musimon*) e carneiros selvagens (*Ovis canadensis*) também foi descrita, com animais vindo a óbito e apresentando quadros semelhantes aos descritos em ovelhas domésticas (Singer *et al.* 1998; Fernández-Pacheco *et al.* 2008). Ademais, iaques (*Bos grunniens*) infectados por EHDV-2 apresentaram doença clínica e vieram a óbito, sendo observado anorexia, descarga nasal, úlceras na mucosa oral e língua, petéquias em vários órgãos e tecidos e fluido sanguinolento na cavidade torácica e abdominal (Campen *et al.* 2013).

No caso dos carnívoros, Linces (*Lynx lynx*) que ingeriram partes de ruminantes contaminados com BTV apresentaram anemia, lesões vasculares, edema pulmonar, entre outros sinais e vieram a óbito (Jauniaux *et al.*, 2008). Já cachorros infectados por uma vacina contaminada com BTV apresentaram abortos e edema pulmonar (Wilbur *et al.*, 1994; Evermann *et al.*, 2008).

### 3.3.9. Patologia

Os achados de necrópsia de animais acometidos por ambas as doenças se caracterizam por lesões hemorrágicas e edema generalizado, petéquias, equimoses e hiperemia em vários órgãos, áreas de erosões e ulcerações com lesões necróticas no trato gastrointestinal e edema pulmonar. Alguns achados mais relevantes são: hemorragia na túnica média da artéria pulmonar na aorta, edema pulmonar, cianose da mucosa oral, hemorragia na subserosa do piloro, áreas de necrose nos músculos esqueléticos e coração, inflamação no trato respiratório superior, efusão na cavidade torácica, pneumonia bronco lobular bilateral, pleurite, pericardite, enterites e congestão da lâmina do casco e da banda coronária, com anéis de crescimento e descamação da parede do casco. O baço, linfonodos, em especial o mesentérico, e tonsilas podem estar hipertrofiados e com hemorragias, podendo apresentar petéquias. Também podem ser visualizadas petéquias na base da língua, saco pericárdico, rins, intestino, coração, músculo esquelético, rúmen e tecidos subcutâneos (Shope *et al.*, 1960; Quist *et al.* 1997; Mauroy *et al.*, 2008; Darpel *et al.*, 2009; MacLachlan *et al.*, 2009; Favero *et al.*, 2013; MacLachlan *et al.*, 2015).

As principais lesões microscópicas incluem hipertrofia e dano endotelial generalizado, edema perivascular, congestão e hipertrofia vascular, hipóxia tecidual, hiperemia, hemorragia e trombose com infarto tecidual. Na musculatura cardíaca e esquelética é possível observar infiltrado inflamatório de células mononucleares, fibrose, hemorragia e necrose (Tweedle and Mellor, 2002; MacLachlan *et al.*, 2009; Alfieri *et al.*, 2017).

### 3.3.10. Diagnóstico

O diagnóstico de BT e EHD é feito ao associar os dados da anamnese, os sinais clínicos dos animais e os resultados dos diagnósticos laboratoriais, assim permitindo diferenciar essas doenças de outros diagnósticos diferenciais, como Febre Catarral Maligna, Doença Hemorrágica por Adenovírus, Febre Aftosa, Estomatite Vesicular, Diarréia Viral Bovina, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, entre outras (Williamson *et al.*, 2008; Cubas *et al.*, 2014; Maclachlan *et al.*, 2015). Além disso, como os sinais clínicos do BTV e EHDV são similares e ambos compartilham hospedeiros susceptíveis, é necessário o diagnóstico laboratorial para diferenciar as duas infecções, já que na maioria das áreas infectadas ambos os vírus circulam ao mesmo tempo. Ademais, os testes laboratoriais permitem a identificação de animais assintomáticos e subclínicos. Os testes utilizados para ambos os vírus podem ser divididos em métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos mais utilizados são o isolamento viral e testes moleculares como reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa convencional (RT-PCR) e em tempo real (qRT-PCR) e sequenciamento genético. Já os testes indiretos permitem identificar se os animais possuem anticorpos contra os agentes infecciosos estudados e incluem testes sorológicos como imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), soroneutralização (SN), reações de imunofluorescência (RIF), imuno-histoquímica (IHQ), entre outros (Stallknecht e Howerth, 2004; Wilson *et al.*, 2015; Kawanami *et al.*, 2018; Dommergues *et al.*, 2019; WOA, 2019a, b).

O isolamento viral, pode ser realizado em ovos de galinha embrionados, porém atualmente é mais utilizado células de inseto, *Aedes albopictus* clone C6/36 e de *Culicoides sonorensis* (KC), e células de mamíferos, BHK-21 (células de rim de hamster recém-nascido) ou células VERO (células de rim de macaco verde africano). As células de inseto não apresentam efeito citopático (ECP), mas são muito eficientes para a multiplicação viral. Já as células de mamíferos apresentam ECP e são utilizadas para visualizar os efeitos causados pelos vírus nas células e para titulação viral. Porém, apesar de ser considerado o teste padrão ouro, o isolamento viral é muito difícil de ser realizado, por ser demorado e necessitar de pessoas treinadas (Maclachlan, 2015; Wilson *et al.*, 2015; WOA, 2019a, b).

Para diagnóstico de BTV e EHDV os testes moleculares mais utilizados são a RT-PCR e qRT-PCR por serem rápidos, sensíveis e poderem utilizar diferentes tipos de amostras. Uma preocupação importante antes de realizar estes testes é a metodologia da extração dos ácidos nucleicos, já que ela vai interferir diretamente na qualidade do material genético adquirido (Maan *et al.*, 2010; Maclachlan, 2015; Wilson *et al.*, 2015; Maan *et al.*, 2017; WOA, 2019a, b). Para diagnóstico de PCR geralmente são utilizados *primers* para os genes do seg-10, no caso do BTV, e do seg-9, no caso do EHDV (Orru *et al.*, 2006; Maan *et al.*, 2010; Maan *et al.*, 2017). O seg-10, que codifica a proteína NS3/NS3a é utilizado por ser muito conservado entre os sorotipos de BTV. Outro gene possível de utilizar é o seg-9 que também é bastante conservado (Orru *et al.*, 2006; Maan *et al.*, 2017). O uso do seg-9 no diagnóstico de EHDV segue o mesmo princípio do diagnóstico de BTV, já que ao utilizar um gene conservado, permite a identificação de diferentes sorotipos dentro do grupo EDHV ou BTV (Clavijo *et al.*, 2002). Para identificar o sorotipo dentro desses grupos é necessário obter a sequência da VP2 (Maan *et al.*, 2011; Maclachlan, 2015; Wilson *et al.*, 2015; WOA, 2019a, b).

Os testes sorológicos são muito utilizados para avaliar a imunidade dos animais, distribuição viral e contato prévio com o vírus. Os mais utilizados para BTV e EHDV são o SN, o IDGA e o ELISA. A SN identifica anticorpos específicos para cada sorotipo de BTV e EHDV. Desta forma, caso não se conheça os sorotipos circulantes da região, se torna um teste complexo de ser realizado. Já o IDGA e o ELISA são menos específicos que a SN, porém são mais simples de serem realizados, já que apenas identificam se o animal possui ou não anticorpos contra o vírus, identificando o grupo BTV ou EHDV, mas não identificando os sorotipos. Desta forma, são muito utilizados em estudos epidemiológicos. Um problema destes dois testes é a possibilidade de ocorrer reação cruzada entre o BTV e o EHDV, por serem muito similares (Maclachlan, 2015; Wilson *et al.*, 2015; WOA, 2019a, b).

A histopatologia permite a identificação de lesões microscópicas características dos vírus. Os testes de imunofluorescência e imuno-histoquímica permitem a identificação das proteínas virais nos tecidos (Maclachlan, 2015; Wilson *et al.*, 2015; WOA, 2019a, b)

Para o diagnóstico de BT e EHD em animais vivos normalmente é utilizado sangue em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), heparina ou citrato, sendo amostras de indivíduos na fase aguda da doença um excelente material. Já, para o diagnóstico de animais que vieram a óbito, podem ser utilizados órgãos refrigerados, em especial baço, pulmão, linfonodos e fígado, também

sendo possível com músculo esquelético e coração, se houver lesões, e cérebro, no caso de fetos. Com estes materiais é possível realizar o isolamento viral e os testes moleculares. Também é possível realizar os testes sorológicos ao separar o soro ou plasma do sangue (Thevasagayam *et al.*, 1995; Tweedle and Mellor, 2002; Alves *et al.*, 2009; Spickler, 2015; Maan *et al.*, 2017; More *et al.*, 2017; Sailleau *et al.*, 2019; Spickler, 2019; WOA, 2019a, b; Saminathan *et al.*, 2020).

Caso cervídeos venham a óbito com doença hemorrágica, além dos testes para BTV e EHDV, é importante realizar o diagnóstico diferencial para Doença Hemorrágica por Adenovírus (AHD), já que apresentam sinais clínicos e lesões similares (Woods *et al.*, 1996). A AHD causou a morte de centenas de cervídeos de vida livre nos EUA e de alces (*Alces alces*) no Canadá (Woods *et al.*, 1996; Sorden *et al.*, 2000; Shilton *et al.*, 2002). No Brasil ainda não existem relatos de AHD. O diagnóstico de infecção por adenovírus pode ser feito por isolamento viral, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão (Woods *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1999; Kawanami, 2012). Os testes sorológicos são SN e ELISA (Lapointe *et al.*, 2000).

### 3.3.11. Prevenção e controle

BTV e EHDV são doenças de notificação obrigatória para a WOA (OIE, 2008; WOA 2019a; WOA, 2019b) e para o MAPA (MAPA, 2013). Por serem transmitidas por um vetor biológico o controle destas doenças é um desafio e para tal deve-se utilizar um conjunto de métodos como vacinação, controle dos vetores e monitoramento dos hospedeiros (Lobato *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Spickler, 2019; WOA, 2019a, b; Saminathan *et al.*, 2020). Atualmente não existe nenhum tratamento específico para estas doenças, sendo preconizado o uso de terapias de suporte como anti-inflamatórios não esteroidais, fluidoterapia e antibioticoterapia (Tweedle and Mellor, 2002; Bianchi *et al.*, 2017; WOA, 2019a, b).

A melhor forma de controle de BTV e de EHDV é o uso de vacinas, porém atualmente não existe nenhuma autorizada para uso no Brasil já que ainda não se sabe ao certo quais os sorotipos circulantes em cada região. Além disso, as vacinas para estes vírus não são aprovadas para uso no país tanto pela baixa notificação quanto pelo baixo índice de diagnósticos realizados para estas doenças. As vacinas devem ser multivalentes já que a imunidade humoral é específica, não havendo proteção cruzada. Devido aos poucos estudos relatando os sorotipos de BTV e EHDV circulantes no Brasil, o desenvolvimento destas vacinas comerciais se torna mais complexo, sendo uma alternativa o uso de vacinas autógenas. A vacinação não impede a infecção, mas resulta em sinais mais leves, diminuição da viremia, auxilia na sobrevivência de animais, reduzindo a morbidade e mortalidade, além de diminuir a transmissão para os vetores (MacLachlan *et al.*, 2015; Lobato *et al.*, 2015; MacLachlan *et al.*, 2019; WOA, 2019a, b).

Outras medidas importantes para o controle destas doenças são relacionadas a prevenção à exposição dos animais aos *Culicoides*, como por meio da restrição de áreas em que estes insetos possuem maior prevalência. Como por exemplo, alojar os animais em estábulos telados do pôr do sol até o nascer do sol, uso de inseticidas e repelentes de insetos. Porém, o controle dos vetores é difícil pela alta densidade populacional destes insetos e extensa variedade de locais que se reproduzem (Tweedle and Mellor, 2002; Lobato *et al.*, 2015; MacLachlan *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Spickler, 2019; WOA, 2019a, b; Saminathan *et al.*, 2020).

Ademais, medidas importantes para prevenção de surtos dessas doenças são: quarentena, programas de vigilância, fiscalização de animais sentinelas, controle do movimento de animais, monitoramento de animais selvagens susceptíveis, diagnóstico de animais assintomáticos, assim como a melhora na comunicação de casos destas doenças para um melhor entendimento de suas distribuições. Porém, em áreas epidêmicas e endêmicas algumas destas ações se tornam complexas devido à quantidade de vetores biológicos, de sorotipos circulantes e de animais infectados (Lobato *et al.*, 2015; MacLachlan *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Spickler, 2019; WOA, 2019a, b; Saminathan *et al.*, 2020).

Desta forma, é necessário realizar a fiscalização frequente destas doenças no campo. Somando a variedade de sinais clínicos e hospedeiros da BT e da EHD, os veterinários devem considerar a possibilidade destas enfermidades como diagnósticos diferenciais em ruminantes domésticos e selvagens. Para auxiliar estas medidas, é essencial o uso de métodos diagnósticos adequados (Tweedle and Mellor, 2002; Lobato *et al.*, 2015; MacLachlan *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Spickler, 2019; WOA, 2019a, b; Saminathan *et al.*, 2020).

### 3.4. *Culicoides*

Os *Culicoides* Latreille, 1809, popularmente denominados no Brasil como maruim, mosquito pólvora ou mosquito do mangue, pertencem à ordem Diptera e à família Ceratopogonidae. Foram identificadas cerca de 1.368 espécies vivas e 52 fósseis, sendo um total de 1.420 espécies já catalogadas de *Culicoides* no mundo e destas 299 espécies são encontradas no Brasil (Lobato *et al.*, 2015; Farias, Almeida & Pessoa, 2016; Borkent & Dominiak, 2020; Santarém & Felipe-Bauer, 2021; Rios *et al.*, 2021). Os *Culicoides* são um dos menores insetos hematófagos variando entre 1,5 a 5 mm de comprimento e os adultos possuem padrão crepuscular. Algumas características que diferenciam os *Culicoides* dos outros *Ceratopogonídeos* são todas as espécies deste gênero possuírem o primeiro tarsômero posterior com cerdas esparsas e sem distribuição uniforme; o segmento antenal apical arredondado ou afilado; as antenas das fêmeas possuem 13 segmentos, sendo os quatro mais próximos ao segmento terminal mais longos que os oito mais basais; possuírem a segunda célula radial na asa arredondada apicalmente; e as suas asas serem cinzas, com a maioria das espécies possuindo manchas características que permitem a identificação (Lutz, 1913; Farias, Almeida & Pessoa, 2016; Rios *et al.*, 2021). É importante ressaltar que apesar da diversidade de espécies presentes no gênero *Culicoides*, ainda faltam muitas informações e estudos sobre estes insetos, sendo muitas destas espécies mal classificadas, suas características pouco entendidas e ainda existem muitas espécies não catalogadas (Borkent & Dominiak, 2020).

Estes insetos se reproduzem em locais úmidos, quentes e ricos em matéria orgânica próximo de hospedeiros vertebrados para realizarem o repasto (Mellor *et al.*, 2000). Podem ser encontrados em todos os continentes, exceto a Antártida, em altitudes de até 4000m, e são muito influenciados por fatores ambientais como umidade e temperatura, havendo uma redução da população destes insetos durante épocas frias e secas e um aumento em épocas quentes e úmidas (Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Lobato *et al.*, 2015; Ruder *et al.*, 2015; Santarém & Felipe-Bauer, 2016; Borkent & Dominiak, 2020). O ciclo de vida destes insetos dura de duas a quatro semanas, consistindo dos estágios de ovo, quatro fases larvais, pupa e adultos. Para o desenvolvimento das fases imaturas é necessário local úmido, sendo encontrados em uma grande variedade de habitats, podendo variar de rios e lagoas até fezes e vegetação em decomposição, porém o substrato de preferência para a oviposição varia entre as diferentes espécies e a caracterização de tais locais pode auxiliar na compreensão da distribuição destes insetos. Os ovos são geralmente colocados em lotes aderidos ao substrato, eles não são resistentes a dessecação e eclodem de dois a sete dias após a postura. As larvas de *Culicoides* podem se alimentar de material orgânica presente no substrato como fungos e plantas ou podem ser predadoras de outros animais presentes no local como nematoides e outras larvas. Desta forma, o conteúdo do substrato pode levar a uma seleção de diferentes espécies. Sendo espécies termofílicas, estes insetos necessitam de temperaturas superiores à 10°C ou 15 °C, dependendo da espécie, para se multiplicar e aumentam sua replicação com a elevação das temperaturas, tendo sua maior atividade entre 13 °C e 35 °C (Blanton & Wirth, 1979; Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Mellor, Carpenter & White, 2009; Tweedle and Mellor, 2002; Veronesi *et al.*, 2009). Os adultos geralmente vivem de dez a vinte dias, podendo chegar até noventa dias em climas mais frios (Mellor, Boorman & Baylis, 2000). Foi relatado que a diversidade de *Culicoides* é maior em ambientes naturais do que os modificados para uso em agricultura (Kameke *et al.*, 2021). As fêmeas precisam se alimentar de sangue antes da oviposição podendo realizar múltiplos repastos, já os machos só se alimentam em fluidos de plantas (Mellor, Boorman & Baylis, 2000). Pouco é conhecido sobre os hábitos reprodutivos das diferentes espécies de *Culicoides*, alguns são eurígamos, precisam de enxame para acasalar, enquanto algumas espécies são estenogâmicas, irão acasalar em espaços restritos (Erram & Burkett-Cadena, 2021; Linley & Adams, 1972). Os *Culicoides* são considerados insetos exofágicos, que se alimentam em ambientes abertos, e exofílicos, que vivem em locais abertos, mas algumas espécies podem se alimentar em locais fechados (Baldet *et al.*, 2008). E estes insetos podem voar uma distância de até dois quilômetros e devido ao seu tamanho reduzido podem ser facilmente levados pelo vento, podendo ser transportados de forma passiva até 700 km (Ducheyne *et al.*, 2007). Nos estudos morfológicos, as fêmeas adultas podem ser divididas em quatro estágios, denominados estágios gonadotróficos, sendo eles nulípara ou não pigmentado, alimentada com sangue ou ingurgitada, grávida e parida ou pigmentada, como demonstrado na Figura 1 (Larska *et al.*, 2017).

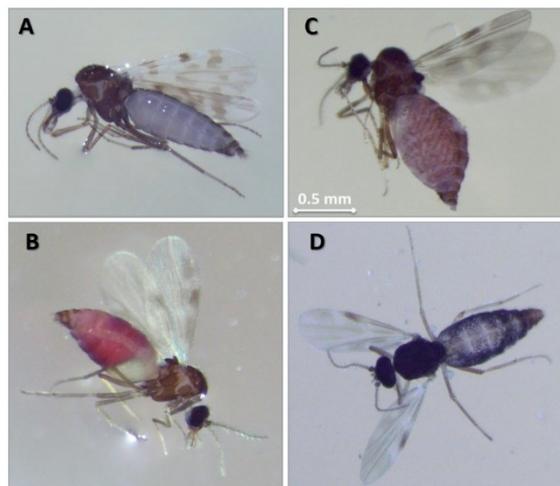


Figura 1: Estágios gonotróficos de *Culicoides punctatus*. A: Nulípara ou não pigmentado. B: Alimentada com sangue ou ingurgitada. C: Gravídica. D: Parida ou pigmentada (Larska et al., 2017).

Os *Culicoides* podem transmitir uma grande variedade de nematóides, protozoários, bactérias e arbovírus para humanos e animais. Dentre as arboviroses transmitidas por estes insetos algumas mais relevantes são BTV, EHDV, Peste Equina Africana, Vírus do Nilo Ocidental, Vírus Oropouche, Encefalite Equina, Vírus de Akabane, Vírus da Febre Efêmera Bovina, Vírus Palyam e Vírus de Schmallenberg (Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Mullen, 2002; Sabio et al. 2006; Vasconcelos et al., 2008; Purse et al., 2015). Também podem transmitir endoparasitas importantes como *Leishmania* sp., *Haemoproteus* spp., *Trypanosoma* spp. e *Mansonella* sp. (Bennett 1961; Fallis and Bennett 1961; Damasceno, 2009; Rebêlo et al., 2016). Além das doenças que estes insetos podem transmitir, suas picadas geram desconforto, dor e podem desencadear dermatites alérgicas (Corrêa et al, 2007).

Ao ingerirem sangue de ruminantes virêmicos com BTV ou EHDV, estes vírus se multiplicam no trato digestivo destes insetos que em seguida é liberado na hemocele, possibilitando a infecção de outros órgãos, especialmente as glândulas salivares, local de replicação viral que possibilita a transmissão. Este período entre a ingestão do sangue virêmico e o inseto estar apto a transmitir os vírus e denominado de período de incubação extrínseco (PIE) e pode durar de dois a vinte dias dependendo da temperatura, sendo este PIE menor quanto maior a temperatura e em temperaturas baixas inferiores à 12°C não ocorre transmissão. Os insetos permanecem infectados durante toda a vida (Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Tweedle and Mellor, 2002; Mellor, Carpenter & White, 2009).

Apesar de existirem várias espécies desses insetos, somente uma pequena porção delas é capaz de transmitir BT e EHD. O principal vetor na África é o *C. imicola*, na Europa este também é o principal vetor, junto com membros dos grupos *C. obsoletus* e *C. pulicaris*. Já na Ásia ainda não se sabe qual o principal vetor, porém algumas das espécies identificadas são o *C. imicola*, *C. brevitarsis*, *C. wadai*, *C. fulvus*, entre outros. Na Australásia as espécies identificadas como competentes são *C. brevipalpis*, *C. peregrinus*, *C. fulvus*, *C. wadai*, *C. actoni* e *C. brevitarsis*. E na América do Norte o principal vetor é o *C. sonorensis* (Mellor, Carpenter & White, 2009; Tabachnick, 2010). Já na América do Sul e Central, o *C. insignis* Lutz, 1913, e o *C. pusillus* Lutz, 1913, são os vetores competentes descritos, porém este possui uma distribuição mais restrita que o *C. insignis*. (Greiner et al. 1992; Mo et al. 1994; Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Mellor, Carpenter & White, 2009; Tabachnick, 2010). Estes insetos são a principal forma de transmissão de BTV e EHDV, sendo a ocorrência das doenças limitada às áreas em que estes dípteros são encontrados, desta forma a distribuição de BT e EHD ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo. Porém, com o aquecimento global as áreas que estes insetos e consequentemente que estas doenças são encontradas está se expandindo (Lobato et al., 2015; Ruder et al, 2015).

O *C. insignis* pertence ao subgênero *Hoffmania* Fox e além de ser o vetor de BTV e EHDV na América do Sul, também está relacionado com a ocorrência de dermatite alérgica devido a sua picada em ovelhas, cavalos, vacas, bodes e seres humanos. Sua distribuição é dos EUA até a Argentina, no Brasil já foi encontrado no Amazonas, Pará, Rondônia, Alagoas, Bahia, Ceará,

Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Corrêa et al., 2007; Mellor, Carpenter & White, 2009; Tabachnick, 2010; Farias, Almeida & Pessoa, 2016; Santarém & Felipe-Bauer, 2021). Em especial adultos tendem a realizar a oviposição em lama, podendo ou não conter fezes de animais, do local em que se desenvolveram. Outros fatores ambientais, como vegetação podem alterar as taxas de oviposição, porém atualmente pouco é conhecido sobre as preferências e requerimentos de oviposição desta espécie. O comportamento reprodutivo do *Culicoides insignis* não foi descrito até o presente momento (Erram & Burkett-Cadena, 2021). Já o *C. pusillus* pertence ao subgênero *Avaritia* Fox e pode ser encontrado dos EUA até o nordeste da Argentina, no Brasil já foi identificado no Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Mellor, Carpenter & White, 2009; Farias, Almeida & Pessoa, 2016; Santarém & Felipe-Bauer, 2021).

Outra espécie importante de ser descrita é o *C. debilipalpis*, subgênero *Haematomyidium*, que já foi associado com a possibilidade de transmissão de BTV e EHDV em estudos realizados na América do Norte (Mullen et al., 1985a e b; Smith & Stallknecht, 1996; Becker et al. 2010; Savini et al., 2011; McGregor et al. 2018; Becker et al. 2020; McGregor, Shults & McDermott, 2022). É considerado uma espécie silvestre encontrada do sul dos EUA até a Argentina, no Brasil já foi identificado no Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina, sendo comum em áreas de florestas (Farias, Almeida & Pessoa, 2016; Santarém & Felipe-Bauer, 2021; McGregor, Shults & McDermott, 2022). Em um teste laboratorial de competência como vetor, *C. debilipalpis* foram alimentados com sague contendo BTV-11, e foi identificado que após 14 dias eles permaneciam infectados, mostrando que ocorreu replicação viral (Mullen et al. 1985b). Em outro experimento, em que o *C. debilipalpis* (no estudo denominado *C. lahillei*, por ser anterior a mudança de nomenclatura para espécie) foi permitido alimentar em veados-de-cauda-branca infectados experimentalmente com EHDV-2, foi isolado vírus deste inseto e foi identificado replicação viral (Smith, Stallknecht & Nettles, 1996). Além disto, em dois estudos realizados em fazendas da Louisiana, EUA, BTV foi identificado por testes moleculares em pools de *C. debilipalpis* (Becker et al., 2010; Becker et al., 2020). Outro fator importante é que foi identificado que esta espécie possui preferência por se alimentar de cervídeos, sendo encontrado durante surtos tanto de BTV quanto de EHDV nestes mamíferos (Smith & Stallknecht, 1996; Becker et al. 2010; McGregor et al., 2018).

### 3.4.1. *Culicoides* no Brasil com foco no Estado de Minas Gerais

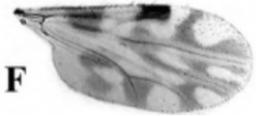
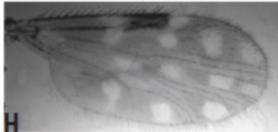
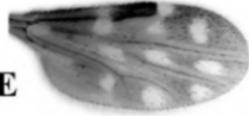
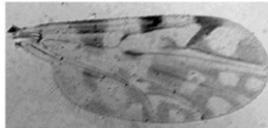
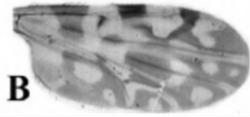
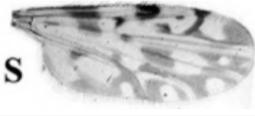
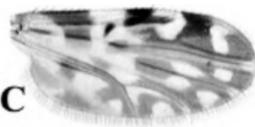
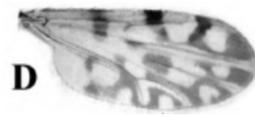
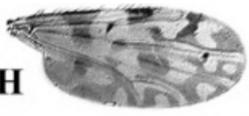
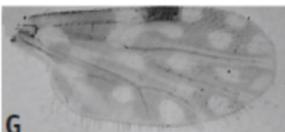
Das espécies 299 de *Culicoides* encontradas no Brasil, as frequentemente encontradas nos estudos de realizados no país são: *C. insignis*, *C. foxi*, *C. paraenses*, *C. venezuelensis*, *C. lahillei*, *C. leopoldoi* e *C. limai*. Outras espécies encontradas em menores quantidades, mas que ainda são importantes para diferentes estudos são, *C. acotylus*, *C. antunesi*, *C. bimaculatus*, *C. brasilianum*, *C. bricenoi*, *C. debilipalpis*, *C. diabolicus*, *C. duartei*, *C. guyanensis*, *C. maruim*, *C. lutzii*, *C. paraignacoi*, *C. sparamaruim*, *C. phlebotomus*, *C. plaumanni*, *C. pusillus* e *C. todatangae* (Gorsch et al. 2002, Ronderos et al. 2003, Corrêa et al. 2007, Carvalho & Silva, 2014; Santarém & Felipe-Bauer, 2021). Diferentes espécies de *Culicoides* encontrados na América do Sul, em especial no Brasil são vetores de doenças para os animais, como os *C. pusillus* e *C. insignis*, que foram associados com a transmissão de *Orbivirus* e o *C. paraenses* é o vetor do vírus Oropouche (Pinheiro et al., 1981; Mo et al., 1994).

Existe uma variação entre a quantidade de espécies e quantidade de indivíduos identificados em cada captura dependendo do estado brasileiro, sendo maior nos estados do norte e menor nos estados do sul e sudeste. As capturas realizadas no norte do país tendem a conseguir uma variedade maior e um número maior de *Culicoides*, esta variação pode ser resultado das diferenças climáticas entre cada região brasileira (Laender et al., 2004; Farias et al., 2020). Além do clima de cada região, outro fator que afeta a distribuição das populações de maruins é a ação antrópica, existindo diferença entre a quantidade e diversidade destes insetos encontrados em áreas urbanas e rurais (Farias et al., 2020).

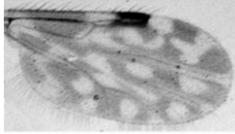
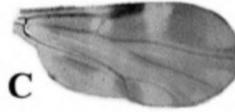
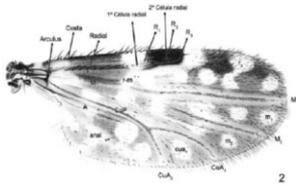
No estado de Minas Gerais foram descritas 18 espécies diferentes de *Culicoides*: *C. antunesi*, *C. boliviensis*, *C. espinolai*, *C. fernandoi*, *C. foxi*, *C. guttatus*, *C. guyanensis*, *C. ignacoi*, *C. insignis*, *C. leopoldoi*, *C. limai*, *C. lutzii*, *C. minasensis*, *C. paraenses*, *C. plaumanni*, *C. pusillus*, *C. rachoui* e *C. venezuelensis* (Coquille, 1904; Goeldi, 1905; Lutz, 1913; Costa Lima, 1937; Floch & Abonnenc, 1942; Barretto, 1944; Ortiz, 1950; Ortiz & Mirsa, 1950; Ortiz, 1951; Forattini, 1954; Forattini, 1957; Tavares & Souza, 1978; Tavares & Souza, 1979; Spinelli & Wirth, 1984; Felipe-

Bauer, 1987; Felipe-Bauer & Lourenco-de-Oliveira, 1987; Spinelli *et al.*, 1993; Laender *et al.*, 2004; Santarém & Felipe-Bauer, 2021). O *C. insignis* é a espécie mais abundante nas capturas neste estado (Laender *et al.*, 2004). Os padrões das asas de algumas das espécies já descritas em Minas Gerais (MG) podem ser visualizados no Quadro 3.

Quadro 3: Pranchas com imagens de asas de algumas das espécies de Culicoides já descritas em Minas Gerais.

Subgenero/grupo	Espécie	Padrão de asa	Referência
Grupo <i>limai</i>	<i>C. limai</i> Barretto, 1944		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
Haematomyidium Goeldi, 1905	<i>C. paraensis</i> (Goeldi), 1905		Castellón & Veras, 2015
	<i>C. debilipalpis</i> Lutz, 1913		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
Hoffmania Fox, 1948	<i>C. guttatus</i> (Coquillett), 1904		Farias, 2014
	<i>C. ignacioi</i> Forattini, 1957		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
	<i>C. foxi</i> Ortíz, 1950		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
	<i>C. insignis</i> Lutz, 1913		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
	<i>C. lutzi</i> Costa Lima, 1937		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
	<i>C. plaumanni</i> Spinelli, <i>in</i> Spinelli <i>et al.</i> , 1993		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
Grupo <i>reticulatus</i>	<i>C. guyanensis</i> Floch & Abonnenc, 1942		Castellón & Veras, 2015

Continuação Quadro 3.

Grupo <i>fluvialis</i>	<i>C. leopoldoi</i> Ortíz, 1951		Farias, 2014
Avaritia Fox, 1955	<i>C. pusillus</i> Lutz, 1913		Farias, Almeida & Pessoa, 2016
Psychophaena Philippi, 1865	<i>C. venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa, 1950		Ortíz & Mirsa, 1950

### 3.4.2. Preferência alimentar

A identificação do hábito alimentar dos *Culicoides* é essencial na determinação de quais animais podem ser hospedeiros deste inseto e, assim, auxiliar no entendimento da transmissão e epidemiologia de diferentes doenças, já que os hospedeiros são grandes determinantes na transmissão e evolução de patógenos. Além disso, também é possível a identificação de espécies que atuam como reservatórios de diferentes doenças (Bessell *et al.*, 2014; Hopken *et al.*, 2017; England *et al.*, 2020; Snyman 2021). Diferentes análises de preferência alimentar de *Culicoides* focadas em animais domésticos foram realizadas em todo mundo, tendo um menor número de estudos abordando o componente de animais selvagens na alimentação destes insetos. Apesar da considerável importância que estes animais possuem na transmissão de diferentes patógenos (Venter *et al.*, 2012; Snyman 2021).

É descrito que *Culicoides* podem se alimentar de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Borkent, 2005). Análises da preferência alimentar de *Culicoides* identificaram que algumas espécies destes insetos se alimentam de forma generalista, alimentando de diferentes espécies, ou oportunista, se alimentando das espécies mais próximas dos locais em que se encontram, tendendo a se alimentar principalmente de mamíferos e aves. Foi identificado que outras espécies podem ter preferência por se alimentar só de mamíferos ou de aves. Várias espécies variam sua alimentação de acordo com a disponibilidade de hospedeiros e com as mudanças ambientais (Hopken *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2021; Snyman 2021). É relatado que diferentes espécies de *Culicoides* se alimentam de sangue humano, de forma a ser uma relevante preocupação para a transmissão de zoonoses (Snyman 2021).

No passado, testes para a identificação da preferência alimentar de *Culicoides* foram feitos utilizando análises sorológicas (Blackwell, Mordue & Mordue, 1994; Blackwell, Brown & Mordue, 1995). Porém, estas metodologias são complexas e possuem uma sensibilidade limitada. Desta forma, métodos moleculares foram desenvolvidos e são utilizados em diferentes partes do mundo. Vários destes métodos utilizam *primers* baseados em genes universais mitocondriais de vertebrados como o *citocromo oxidase subunidade 1* (Cox 1) e *citocromo b* (Cyt b), além de outros genes como o gene da *prepronociceptina* (PNOC) (Tobe, Kitchener & Linacre, 2010; Hadj-Henni *et al.*, 2015; Hopken *et al.*, 2017; England *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2021; Snyman 2021).

Um estudo comparando a eficiência do Cyt b e do PNOC como marcadores moleculares para a identificação de preferência alimentar em insetos demonstrou uma maior eficiência do gene Cyt b na detecção, sugerindo o uso deste gene para estudos de preferência alimentar (Hadj-Henni *et al.*, 2015). Em outro estudo avaliando a eficiência de genes para a identificação filogenética de diferentes espécies comparou o Cox 1 e o Cyt b, concluiu-se que ambos os primers possuem resultados similares, porém o Cyt b possui maior congruência com filogenia de mamíferos, maior variação de pares de bases em sequências curtas e possui uma taxa menor de falsos positivos em comparação ao Cox 1. Desta forma, este estudo sugere que caso seja necessário escolher

entre os dois genes para análises filogenéticas e de identificação de espécies é preferível o uso do gene Cyt b (Tobe, Kitchener & Linacre, 2010).

Existem poucas informações sobre preferência alimentar de *Culicoides* na América Latina. Um estudo deste tipo realizado no Brasil foi feito na região amazônica utilizando o gene Cyt b. Foi identificado que as espécies de *Culicoides* capturadas no estudo se alimentavam de uma grande variedade de espécies de mamíferos, incluindo tamanduás, primatas não humanos e humanos, e de aves. Demonstrando a existência de espécies generalistas no Brasil e também ressaltando a possibilidade de transmissão de patógenos, em especial zoonoses, por estes insetos (Carvalho *et al.*, 2021).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Locais do experimento

As coletas das amostras de animais durante manejos de rotina e de animais que vieram a óbito foram realizadas na Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH). Além disso, o zoológico também permitiu o uso de amostras armazenadas no banco de soro, o qual é mantido desde 2012. E a coleta de *Culicoides* foi realizada de dezembro de 2021 até novembro de 2022, sendo também realizada na FPMZB-BH.

Os testes laboratoriais assim como o processamento das amostras 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).

### 4.2. Autorizações

O presente projeto foi autorizado pelo SISBIO sob o número: 80725 (Anexo 1), pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo nº 233/2021 (Anexo 2) e pelo FPMZB-BH (Anexo 3).

### 4.3. Amostras estudadas

#### 4.3.1. Amostras de soro e sangue total dos animais vivos da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH)

Amostras de Anta (*Tapirus terrestris*), Cervo-dama (*Dama dama*), Elefante africano (*Loxodonta africana*) e Veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) foram coletadas durante procedimentos de rotina do zoológico, para evitar estresse dos animais, de 2021 a 2022. Estas amostras consistem de sangue em tubos com EDTA, heparina ou citrato, para obtenção de sangue total e gel separador, sem anticoagulante, para obtenção de soro, de acordo com o teste a ser realizado. Os animais foram contidos quimicamente durante a coleta utilizando *Zoletil* 3mg/kg junto com *Xilazina* 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB-BH, o sangue foi coletado e enviado ao LPVA para que fossem realizados os testes diagnóstico.

#### 4.3.2. Amostras do banco de soro da FPMZB-BH

Foram utilizadas neste trabalho 72 amostras de soro, que estavam armazenadas a -20°C, coletadas entre 2012 e 2022, de 62 animais diferentes totalizando 14 espécies, presentes no Banco de soro do Jardim Zoológico de Belo Horizonte. As espécies testadas foram Anta (*Tapirus terrestris*), Camelo (*Camelus bactrianus*), Cervo-dama (*Dama dama*), Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), Cervo-nobre (*Cervus elaphus*), Cobo-de-meia-lua (*Kobus ellipsiprymnus*), Elande (*Taurotragus oryx*), Elefante africano (*Loxodonta africana*), Hipopótamo-comum (*Hippopotamus amphibius*), Lhama (*Lama glama*), Órix (*Oryx gazella*), Rinoceronte-branco (*Ceratotherium simum*), Veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) e Zebra (*Equus quagga*).

### 4.3.3. Amostras de tecido de cervídeos que vieram a óbito na FPMZB-BH

Os animais que vieram a óbito na FPMZB-BH durante o período do estudo com sinais sugestivos para BTV e EHDV foram submetidos a necropsia pela equipe do zoológico ou pela equipe da patologia da Escola de Veterinária da UFMG. Foram coletadas amostras com cerca de dois gramas de baço, pulmão, linfonodos, fígado, medula óssea vermelha e sangue do coração, sendo as mesmas amostras coletadas no caso de aborto ou animal natimorto. As amostras foram refrigeradas e encaminhadas ao LPVA (WOAH, 2019a, b).

As amostras encaminhadas ao LPVA foram submetidas aos testes de qRT-PCR para verificar a possibilidade de infecção por BTV ou EHDV. Todos os testes foram realizados seguindo as metodologias descritas nos manuais da WOA (WOAH, 2019a, b).

Adicionalmente, foram utilizadas amostras de já processadas de uma fêmea de veado-catingueiro encontrada morta no recinto no dia 2 de abril de 2020. Após a necropsia e as análises histopatológicas realizadas pelo setor de patologia da Escola de veterinária da UFMG foi constatado edema pulmonar, úlceras da língua, mucosa oral e vaginal cianóticas, áreas de hemorragia multifocal em diferentes órgãos, como coração, encéfalo, rúmen, intestino, pulmão, baço, fígado, entre outros, variando de discreta a extensa, com trombos, congestão e infiltrado inflamatório. Além disso, o veado possuía um feto no terço médio da gestação que também apresentou hemorragia multifocal em vários órgãos e apresentou petéquias na pele, especialmente na cabeça. Foi realizada qRT-PCR para BTV e EHDV e as amostras coletadas de fígado e rim foram positivas para EHDV. Em conjunto com a análise da necropsia, histopatológicas e o resultado do qRT-PCR é possível dizer que o animal teve uma doença hemorrágica devido a uma infecção por EHDV, doença que pode causar surtos em cervídeos (Anexo 4). As amostras positivas foram utilizadas para isolamento viral e em seguida foi realizada a sorotipagem pelo sequenciamento segmento 2 (seg-2), a amostra sequenciada foi denominada Zoo.

## 4.4. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) de BTV e EHDV

### 4.4.1. Produção do antígeno para IDGA de BTV e EHDV

Para a produção de suspensão viral para fabricação de antígeno para teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi utilizado EHDV-2 NEC2630 isolado no LPVA (Favero *et al.*, 2013) e BTV-4 cedido pelo centro pan-americano de febre aftosa. A produção dos antígenos foi realizada de acordo com os protocolos padronizados no LPVA segundo a WOA (2019a, b).

As suspensões virais de BTV e EHDV foram concentradas de 30 a 40 vezes utilizando o *Labscale TFF System* com dispositivo *Pellicon XL* com filtro de 10 nm. Após a concentração os antígenos foram alíquotados e armazenados a -20°C até serem utilizados para os testes de IDGA.

### 4.4.2. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

Os soros recebidos da FPMZB-BH, provenientes tanto de animais vivos quanto do banco de soros, foram submetidos ao teste de IDGA para BTV e EHDV sendo realizados no LPVA seguindo os protocolos descritos nos manuais da WOA (2019a, b).

O soro padrão de BTV foi obtido de um bovino previamente testado e padronizado frente ao antígeno padrão de BTV. E o soro padrão de EHDV foi obtido de um experimento prévio realizado no LPVA com a produção de soro hiperimune de coelho inoculado com EHDV-2 (Favero *et al.*, 2013; Pinheiro, 2019). As leituras foram realizadas 72 horas após, utilizando-se sistema de iluminação com luz indireta e fundo escuro para visualização de linhas de precipitação antígeno-anticorpo.

## 4.5. Lavagem de hemácias

As amostras de sangue recebidas do zoológico foram primeiramente centrifugadas 3000 rpm, 4°C por 10 minutos para a separação do plasma da amostra. Em seguida é adicionado PBS buffer 1x (pH 7.0-7.4) em volume semelhante ao de plasma retirado das amostras e então foram centrifugadas a 3000 rpm, a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante então é descartado. Este passo

é repetido de três a cinco vezes. Então as hemácias são ressuspensas em um volume 1:1 com PBS 1x e armazenadas a 4 °C (WOAH 2019a, b).

#### 4.6. Reação em cadeia polimerase em tempo real (qRT-PCR) para diagnóstico de BTV e EHDV

O RNA das amostras de órgãos de animais necropsiados e sangue recebidas do zoológico foi extraído utilizando método de Trizol® (Invitrogen™, Califórnia, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de sangue foram processadas pelo protocolo de lavagem de hemácias previamente a extração do material genético. Após a extração do ds-RNA, as amostras foram testadas por qRT-PCR para BTV e EHDV seguindo o protocolo previamente padronizado no LPVA. (WOAH 2019a, b). Para identificação do EHDV utilizou-se *primers* específicos para o gene do seg-9 seguindo o protocolo de Maan *et al.* (2016), enquanto para o BTV foram utilizados *primers* específicos para o seg-10 de acordo com Orru *et al* (2006) (Quadro 4 e 5).

Quadro 4: Primers utilizados para diagnóstico de BTV por qRT-PCR.

Virus	Primer/probe	Oligo name	Sequence (5'-3')
BTV	Forward	Hofm_BTV_IVI_F2	TGGAYAAAGCRATGTCAA
	Reverse	Hofm_BTV_IVI_R2	ACRTCATCACGAAACGCTTC
	Probe	Hofm_BTV_IVI_P	FAM-ARGCTGCATTTCGCATCGTACGC-Tamra

Quadro 5: Primers utilizados para diagnóstico de EHDV por qRT-PCR.

Virus	Primer/probe	Oligo name	Sequence (5'-3')
EHDV	Forward	EHDV_15-32F	ATGTCAGCTGCGGTYTTG
	Reverse	EHDV_112-85R	TCCCAATCAACTAARTGRATYTG VATCT
	Probe	EHDV_69-48P	FAM-CCTCGGTCTGAACGTTGGATCAC-Tamra

Para o mix do qRT-PCR para BTV e EHDV foi utilizado o kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™, Califórnia, EUA). Para o preparo do mix de qRT-PCR para BTV foi utilizado 12,5µl de mix de reação 2x, 0,5 µl de Primer Hofm\_BTV\_IVI\_F2, 0,5 µl de Primer Hofm\_BTV\_IVI\_R2, 1,0 µl da sonda (probe) Hofm\_BTV\_IVI\_P, 2,5 µl de água livre de RNase, 0,5 µl de ROX na diluição 1:10, 1,0 µl de MgSO4 e 0,5 µl de Superscript III RT/Platinum Taq Mix, totalizando 19,0 µl, então são adicionados 6,0 µl de amostras para um volume final de 25 µl. Já para o preparo do mix de qRT-PCR para EHDV foi utilizado 12,5µl de mix de reação 2x, 1,0 µl de Primer EHDV\_15-32F, 1,0 µl de Primer EHDV\_112-85R, 0,5 µl da sonda (probe) EHDV\_69-48P, 4,6 µl de água livre de RNase, 0,5 µl de ROX na diluição 1:10, 1,0 µl de MgSO4 e 0,5 µl de Superscript III RT/Platinum Taq Mix, totalizando 21,6 µl, então são adicionados 3,4 µl de amostras para um volume final de 25 µl.

Para o ciclo do qRT-PCR para BTV foram utilizados um ciclo de 48°C por 30 minutos, um ciclo de 95°C por 2 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. E para o ciclo do qRT-PCR para EHDV foram utilizados um ciclo de 55°C por 30 minutos, um ciclo de 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

#### 4.7. Isolamento de BTV e EHDV

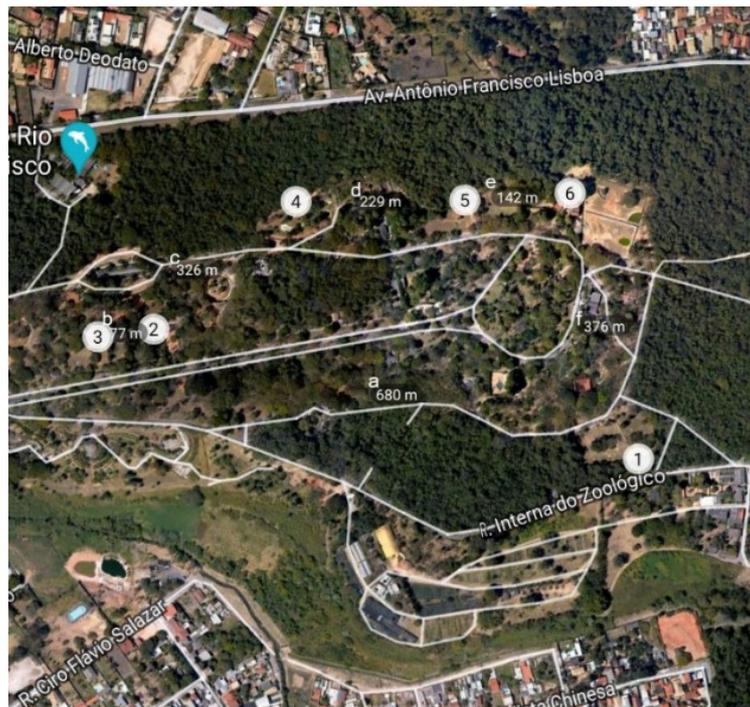
Amostras positivas no qRT-PCR foram submetidas a isolamento viral em células de *Culicoides sonorensis* (KC). As amostras de tecidos macerados e hemácias lavadas foram filtradas com filtro de 0.22µm e inoculadas em células KC em meio Schneider em garrafas A25 (25 cm<sup>2</sup>) e incubadas por 10 dias. Após este período o conteúdo de cada garrafa era utilizado para a infecção de uma nova A25 contendo células KC, foram feitas de 2 a 3 inoculações, seguindo protocolo previamente padronizado no LPVA (WOAH 2019a, b). Após este período o sobrenadante foi coletado e testado novamente usando o protocolo de qRT-PCR para BTV e EHDV. Às amostras de células KC infectadas positivas foram inoculadas em células de mamífero BHK-21 (*Baby Hamster Kidney 21*) seguindo protocolo previamente padronizado no LPVA (WOAH 2019a, b). As suspensões virais coletadas das células BHK-21 infectadas foram armazenadas a 4°C para posteriormente serem submetidas à extração do material genético e sequenciamento para sorotipagem do vírus isolado (Sailleau *et al.*, 2012; WOH 2019a, b).

#### 4.8. *Culicoides*

##### 4.8.1. Captura dos *Culicoides*

Foram utilizadas seis armadilhas, cinco New Standard Miniature Blacklight modelo 1212 (*John W. Hock Company*, Florida, EUA) de sucção, de 220V, com lâmpadas ultravioleta (UV) de 8W (modelo 1212) e uma mini armadilha CDC com luz incandescente (*CDC Mini Light Trap with Incandescent Light*) modificada para conter uma lâmpada Blacklight (UV) (*John W. Hock Company*, Florida, EUA), gentilmente cedidas pelo Instituto Pirbright (Surrey, Inglaterra), para captura dos dípteros e posterior identificação das espécies presentes no FPMZB-BH. As armadilhas foram identificadas de 1 a 6 (A1 a A6). Duas destas armadilhas utilizavam baterias de 6v (A1 e A2) e quatro utilizavam baterias de 12v (A3, A4, A5 e A6), não havendo diferença na eficiência de capturas entre estes dois tipos de armadilhas. As armadilhas foram alocadas a 1,5-2 m acima do nível do solo, e em áreas externas próximas às recintos e áreas de manobra, com uma distância de 50 m de outras fontes de luz (Harrup, 2014; Harrup, 2018).

Antes do início das coletas foi realizada uma visita à FPMZB-BH para avaliar quais seriam os melhores pontos para colocar as armadilhas. Para a seleção desses locais foram avaliados os hospedeiros próximos, locais protegidos de chuvas para colocação das armadilhas, vegetação, distância mínima entre as armadilhas como preconizado (pelo menos 50 metros), além de fontes de luz próximas que podem interferir com as capturas e a altura mínima que deveriam ser colocadas cada armadilha para ter o melhor funcionamento possível. As mesmas armadilhas foram colocadas nos mesmos locais durante todo o experimento e foram utilizadas da forma definida pelos protocolos (Harrup, 2014; Harrup, 2018). A posição de cada armadilha está representada nas Figuras 2 e 3 e os detalhes de cada localização estão presentes no Quadro 6.



a) Distância entre A1 e A2; b) Distância entre A2 e A3; c) Distância entre A3 e A4; d) Distância entre A4 e A5; e) Distância entre A5 e A6; f) Distância entre A6 e A1.

Figura 2: Mapa da vista aérea de parte da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH), com marcação dos locais em que foram instaladas as armadilhas para captura de *Culicoides* spp. Fonte: Imagem modificada de *GLand Measure*.



Figura 3: Mapa de visitação da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH). 1. Armadilha próxima aos recintos do camelo e da lhama.; 2. e 3. Armadilhas próximas aos recintos do cervo-dama, cervo-nobre, cervo-do-pantanal e órix 4. Armadilha no recinto misto da Praça Nacional, que abriga antas, veados-catingueiros, tamanduás-bandeira e emas; 5. Armadilha próxima aos recintos do cobo-de-meia-lua e da zebra; 6. Armadilha entre os recintos dos elefantes e do rinoceronte branco. Fonte: Imagem modificada da Prefeitura de BH (2021).

Quadro 6: Informações de cada localização das armadilhas.

ID armadilha	Localização geográfica	Animais próximos	Vegetação ao redor	Dentro do recinto	Altura da armadilha	Acúmulo de fezes próximas às armadilhas	Fontes de água corrente (córregos ou riachos) próximo
A1	19°51'11,739" S, 44°0'51,876" O	Camelo e lhama	a*	Não	1,50	Sim	Sim
A2	19°51'42,917" S, 44°0'48,032" O	Cervonobre	b**	Sim	1,50	Não	Não
A3	19°51'42,917" S, 44°0'48,032" O	Cervodama e órix	b	Sim	1,50	Não	Não
A4	19°51'42,79" S, 44°0'27,365" O	Recinto misto (veadocatingueiro, anta, tamanduá-bandeira e ema)	a	Não	1,80	Não	Não
A5	19°51'47,369" S, 44°0'33,98" O	cobo-de-meia-lua e zebra	a	Não	1,50	Sim	Não
A6	19°51'49,167" S, 44°0'37,493" O	Elefante e do rinoceronte branco	b	Não	1,50	Sim	Não

\*a) Mata com vegetação alta. \*\*b) Vegetação baixa e gramíneas.

Foram realizadas pelo menos duas coletas por mês, uma a cada duas semanas em datas variadas, evitando colocar as armadilhas em dias de chuva. As coletas iniciaram no dia 09 de dezembro de 2021 e foram finalizadas no dia 18 de novembro de 2022 totalizando 12 meses de coletas e 25 coletas. Uma coleta foi definida como o período entre a colocar e retirar todas as armadilhas. A colocação das armadilhas se dava às 16:00 horas e a retirada às 8:00 horas do dia seguinte (Harrup, 2014).

Em todas as coletas foram anotados dados relativos a data, horário do nascer e pôr do sol, temperatura máxima e mínima, umidade máxima e mínima, estação e luminosidade da lua, precipitação pluviométrica, pressão atmosférica do dia, presença de acúmulo de fezes próxima às armadilhas, funcionamento das armadilhas durante as coletas, temperatura e umidade no momento de colocar e retirar cada armadilha, o total de *Culicoides* coletados e o código de cada captura variando de Z1 para a primeira coleta, no dia 9 de dezembro de 2021, até Z25 para a última coleta, no dia 18 de novembro de 2022. Os insetos capturados foram colocados em frascos de boca larga, abrigados da luz, em álcool 70%, devidamente tampados e identificados no rótulo quanto ao período de coleta e local do zoológico e encaminhados ao LPVA para que a identificação das espécies pudesse ser realizada.

#### 4.8.2. Identificação *Culicoides*

Os frascos com as amostras coletadas na FPMZB-BH foram encaminhados ao LPVA, onde foi feita a identificação e caracterização das espécies de *Culicoides* e do estágio gonadotrófico de cada exemplar, para estudo da distribuição sazonal das diferentes espécies de *Culicoides* (Harrup, 2014).

A identificação morfológica e taxonômica das espécies de *Culicoides* foi realizada examinando os padrões de pigmentação das asas com estereoscópio (*Olympus SZX7*). As chaves de identificação utilizadas para a correta caracterização de cada exemplar foram: Farias (2014), Castellón & Veras (2015), Farias, Almeida & Pessoa (2016), Santarém & Felipe-Bauer (2016), Borkent & Dominiak (2020), Rios et al (2021). Todos os *Culicoides* foram identificados por espécie, gênero e caso fossem fêmeas, estágio gonadotrófico (Figura 1) (Harrup, 2014; Larska et al., 2017). Nos casos em que as identificações da espécie eram mais complexas, necessitando que fossem montadas lâminas para a identificação de dados morfológicos específicos, os insetos foram identificados em grupos. Os exemplares foram armazenados em PBS 1x, caso fossem processados no mesmo dia, e em etanol 70%, para armazenamento dos insetos por períodos maiores (Harrup, 2014).

#### 4.8.3. Teste de identificação da preferência alimentar das espécies de *Culicoides* identificadas

Os abdomens dos *Culicoides* ingurgitados foram separados do resto do inseto utilizando agulhas entomológicas. Em seguida foram colocados em PBS 1x e armazenados a 4°C para posteriormente serem submetidos à extração do material genético. Para a extração de DNA foram utilizados dois kits, segundo a disponibilidade no laboratório. A extração para análise da preferência alimentar foi realizada seguindo os protocolos dos fabricantes dos kits de extração, kit da *Kasvi* (Kit De Extração de DNA *Mini Spin*, número de catálogo K9-1050) e *Roche* (*High Pure Viral Nucleic Acid*, número de catálogo 11858874001). O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

As amostras de DNA extraídas de abdomens de *Culicoides* ingurgitados foram submetidas à reação em cadeia polimerase (PCR) para amplificação do gene citocromo b (Cyt b) para avaliação da preferência alimentar dos insetos coletados segundo protocolo de Carvalho et al. (2021). Os primers utilizados foram cytb 1 5'- CCTTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' e cytb 2 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3', os quais amplificam uma região de 358 pares de bases (bp) da região conservada do Cyt b presente no DNA mitocondrial de vertebrados. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 2% e as que não apresentaram bandas foram submetidas a uma nova reação de PCR, segundo Carvalho et al. (2021), para amplificação do *amplicon* da primeira reação, e foram novamente visualizados em gel de agarose 2%. Todas as amostras que apresentaram banda foram enviadas para o CT Vacinas (Minas Gerais, Brasil) para sequenciamento genético do gene Cyt b.

A sequência consenso foi gerada com base nas sequências *Forward* e *Reverse* utilizando os programas *Bioedit* e *Mega X*. Foi realizado um *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST®) na plataforma do *National Center for Biotechnology information* (NCBI) com a sequências consenso e com o *Forward* e o *Reverse*, o resultado foi anotado em uma tabela para análise. (Sailleau et al, 2012; Viarouge et al.; 2014).

#### 4.9. Sorotipagem de EHDV por sequenciamento do seg-2

O material genético das amostras isoladas em células BHK-21 foi obtido pela metodologia de extração do ds-RNA utilizando método de *Trizol*® (Invitrogen™ Califórnia, EUA) previamente padronizado no LPVA. Esta metodologia foi escolhida por obter um material genético de maior qualidade que possibilita resultados melhores ao ser submetido ao sequenciamento genético.

Após a extração, 1 µl da amostra foi diluído na proporção 1:10 em água *RNase free* e então foi corrida em gel de agarose 2% para avaliação do padrão de migração das bandas segundo descrito por Anthony et al. (2011).

As amostras de ds-RNA obtidas após a extração foram submetidas a reação em cadeia polimerase utilizando retrotranscriptase (RT-PCR) para o Seg-2 de EHDV identificação do sorotipo segundo Sailleau et al. (2012) (Quadro 7). O resultado foi visualizado em gel de agarose

2%. As bandas na altura correta foram cortadas e foram purificadas utilizando o kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*. Os *amplicons* foram enviados para sequenciamento genético do seg-2 no CT Vacinas (Minas Gerais, Brasil) para identificação do sorotipo.

Quadro 7: Lista de primers para sorotipagem de EHDV.

Grupo BTV	Primers	Sequência (5-3')	Localização	Tamanho (pb)	Sorotipo BTV
A	EHDAF	ATACGCCGATATGACTGG	255–272	786	EHDV2, EHDV7
	EHDAR	GATGATAATTCCTTATGTTTCG	1041–1020		
B	EHDBF	ATTATGAGATTTTCATTATGGG	2479–2500	522	EHDV4, EHDV5
	EHDBR	AGCTTCAGTCACGAAGC	3001–2985		
C	EHDCF	GTAAATTATTCCAGGATGG	1–20	391	EHDV6, EHDV8
	EHDCR	TTCCATATTCTGGTTTAATCC	391–372		
D	EHDDF	GTAAATTGTGTCAGGATGG	1–20	820	EHDV1
	EHDDR	CCGTCTACCCATTTTCATCC	820–801		

Após o sequenciamento a sequência consenso foi montada com base nas sequências *Forward* e *Reverse* utilizando os programas *Bioedit* e *Mega X*. Foi realizado um *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®)* na plataforma do *National Center for Biotechnology information (NCBI)* com a sequência consenso e com o *Forward* e o *Reverse*. O resultado foi anotado em uma tabela para que as análises fossem feitas. (Sailleau et al, 2012; Viarouge et al.; 2014).

#### 4.10. Estudo epidemiológico

Foram coletados dados geoespaciais e climáticos utilizando GPS (Sistema de posicionamento global) presente no celular dos pesquisadores, bem como dados presentes no site *The Weather Channel (weather.com)* referentes a localização do experimento (Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e também os dados publicados pelo INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) da mesma região de todas as capturas de *Culicoides*. Além dos dados geoespaciais e climáticos, foram anotadas informações dos animais soropositivos para BTV e/ou EHDV e dos casos de animais que vieram a óbito com sinais clínicos compatíveis com infecção por estes dois vírus. Estes dados, em conjunto com os resultados dos testes de diagnóstico, foram utilizados para um estudo da situação epidemiológica do Jardim Zoológico de Belo Horizonte em relação ao BTV e EHDV.

#### 4.11. Estatística

Análises univariadas e multivariadas do risco relativo das diferentes coletas de *Culicoides* foi realizada, relacionando o número de insetos coletados com fatores de risco como umidade do ar, temperatura, índice pluviométrico, luminosidade, estação do ano, velocidade do vento, pressão atmosférica e estação da lua. As análises foram feitas utilizando programas como Excel Windows, JAMOVI e STATA.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Testes sorológicos

Foram testadas para BTV e EHDV 72 amostras de soros coletadas de 2012 a 2022, de 14 espécies, recebidas do banco de soros da FPMZB-BH, Anta (*Tapirus terrestris*), Camelo (*Camelus bactrianus*), Cervo-dama (*Dama dama*), Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), Cervo-nobre (*Cervus elaphus*), Cobo-de-meia-lua (*Kobus ellipsiprymnus*), Elande (*Taurotragus oryx*), Elefante africano (*Loxodonta africana*), Hipopótamo (*Hippopotamus amphibiu*), Lhama (*Lama glama*), Órix (*Oryx gazella*), Rinoceronte-branco (*Ceratotherium simum*), Veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) e Zebra (*Equus quagga*) e de animais que foram submetidos a manejos de rotinas durante o projeto, de 2021 a 2022.

Treze amostras (cinco cervos-dama, um Cervo-nobre, um Cobo-de-meia-lua, três Órix, um Rinoceronte-branco e dois Veados-catingueiros) não foram testadas para EHDV por não haver volume suficiente. Além destas, algumas amostras apresentaram contaminação bacteriana e fúngica impossibilitando a leitura. O resultado dos testes pode ser visualizado nos Quadros 8, 9, 10 e 11.

Quadro 8: Resultados do teste de IDGA por espécie estudada para BTV e EHDV utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH.

Espécie		Resultado IDGA BTV			Resultado IDGA EHDV		
Nome comum	Nome científico	Positivos	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	2	3	5	0	5	5
Camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	2	3	5	0	5	5
Cervo-dama	<i>Dama dama</i>	17	1	18	2	11	13
Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	1	0	1	0	1	1
Cervo-nobre	<i>Cervus elaphus</i>	6	0	6	1	4	5
Cobo-de-meia-lua	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	1	1	2	0	1	1
Elande	<i>Taurotragus oryx</i>	1	0	1	0	1	1
Elefante africano	<i>Loxodonta africana</i>	1	0	1	0	1	1
Hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibiu</i>	0	1	1	0	1	1
Lhama	<i>Lama glama</i>	5	1	6	1	5	6
Órix	<i>Oryx gazella</i>	9	0	9	3	3	6
Rinoceronte-branco	<i>Ceratotherium simum</i>	0	2	2	0	1	1
Veado-catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	9	4	13	4	7	11
Zebra	<i>Equus quagga</i>	0	2	2	0	2	2
Total		54	18	72	11	48	59

Quadro 9: Resultados do teste de IDGA por animal testado para BTV utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH, dividido por animal testado indicado pela data dos resultados. Foram omitidos resultados em datas similares.

Espécie		ID	Resultado IDGA BTV	
Nome comum	Nome científico		Positivos	Negativos
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	Vaudinho		2014
		Estrela	2017 e 2020	2019
		Pia		2022
Camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	Calif		2012
		Sarah		2012 e 2014
		Nataline	2016 e 2018	
Cervo-dama	<i>Dama dama</i>	600A921	2012, 2014	
		129	2013	
		127	2012 e 2013	
		Femea velha	2014	
		205266	2015	
		MP04	2016	
		195114	2016	
		MP08	2018	
		226335	2018	
		206125	2018	
		034	2019	
		49052	2019	
		136	2019	
		05122019		2019
		CD200222	2022	
CD0604	2022			
Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Linda	2013	
Cervo-nobre	<i>Cervus elaphus</i>	128	2012	
		21718	2013	
		Carlos	2013	
		Quarentena	2014	
		Maradona	2019	
		138	2020	
cobo-de-meia-lua	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Mais Velha	2016	
		Quarentena		2018
Elande	<i>Taurotragus oryx</i>	Herlandes	2012	
Elefante africano	<i>Loxodonta africana</i>	Beré	2021	
Hipopótamo-comum	<i>Hippopotamus amphibiu</i>	Aisha		2019
Lhama	<i>Lama glama</i>	Luiza	2012	
		Figuinho		2012
		Pé de pano	2015	
		Sabaya	2018 e 2019	
		Ziguinho	2019	

Continuação Quadro 9.

Órix-do-cabo	<i>Oryx gazella</i>	G2	2012 e 2015	
		130	2012	
		21712 (filhote)	2013	
		25455	2014	
		4899504	2014	
		140	2014	
		712	2015	
		312	2016	
Rinoceronte-branco	<i>Ceratotherium simum</i>	Dorah		2015 e 2017
Veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	034	2012	
		64CE8B9		2012
		063		2013
		21704		2014
		481687	2015 e 2016	
		011	2016	
		058	2018	
		Elisa		2018
		279940 (VC270122)	2022	
		908471	2022	
		VC010222	2022	
15022022	2022			
Zebra	<i>Equus quagga</i>	Zure		2016
		Zauck		2017

Quadro 10: Resultados do teste de IDGA por animal testado para EHDV utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH, dividido por animal testado indicado pela data dos resultados. Foram omitidos resultados em datas similares.

Espécie		ID	Resultado IDGA EHDV	
Nome comum	Nome científico		Positivos	Negativos
Anta	Tapirus terrestris	Vaudinho		2014
		Estrela		2017,2019 e 2020
		Pia		2022
Camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	Calif		2012
		Sarah		2012 e 2014
		Nataline		2016 e 2018
Cervo-dama	<i>Dama dama</i>	600A921		2012
		129		2013
		127		2012 e 2013

Continuação Quadro 10.

Cervo-dama	<i>Dama dama</i>	Femea velha		2014
		205266		2015
		MP04		2016
		195114	2016	
		226335		2018
		034		2019
		136	2019	
		CD200222		2022
		CD0604		2022
Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Linda		2013
Cervo-nobre	<i>Cervus elaphus</i>	128		2012
		21718	2013	
		Carlos		2013
		Quarentena		2014
		Maradona		2019
cobo-de-meia-lua	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Mais Velha		2016
Elande	<i>Taurotragus oryx</i>	Herlandes		2012
Elefante africano	<i>Loxodonta africana</i>	Beré		2021
Hipopótamo-comum	<i>Hippopotamus amphibiu</i>	Aisha		2019
Lhama	<i>Lama glama</i>	Luiza	2012	
		Figuinho		2012
		Pé de pano		2015
		Sabaya		2018 e 2019
		Ziguinho		2019
Órix-do-cabo	<i>Oryx gazella</i>	G2	2015	2012
		130	2012	
		21712 (filhote)		2013
		25455		2014
		712	2015	
Rinoceronte-branco	<i>Ceratotherium simum</i>	Dorah		2015
Veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	034		2012
		64CE8B9		2012
		063		2013
		481687	2015 e 2016	
		011	2016	
		058		2018
		279940 (VC270122)		2022
		908471	2022	
		VC010222		2022
		15022022		2022
Zebra	<i>Equus quagga</i>	Zure		2016
		Zauck		2017

Quadro 11: Comparação do resultados do teste de IDGA para BTV e EHDV nos diferentes anos testados, utilizando amostras recebidas da FPMZB-BH. Foram omitidos resultados em datas similares.

Ano	Resultado IDGA BTV			Resultado IDGA EHDV		
	Positivos	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
2012	8	4	12	2	10	12
2013	6	1	7	1	6	7
2014	6	3	9	0	5	5
2015	5	1	6	3	3	6
2016	7	1	8	3	4	7
2017	1	2	3	0	2	2
2018	6	2	8	0	4	4
2019	6	3	9	1	6	7
2020	2	0	2	0	1	1
2021	1	0	1	0	1	1
2022	6	1	7	1	6	7
Total	54	18	72	11	48	59

Os Quadros 8, 9, 10 e 11 apresentam os resultados dos testes de IDGA para BTV e EHDV. Como é possível visualizar, os testes de BTV mostraram uma taxa 75% (54/72) de animais positivos, enquanto os de EHDV apresentaram somente 19% (11/59) de positividade. O grande número de cervos-dama, cervo-do-pantanal, cervos-nobre e veados-catingueiros soropositivos para o teste de BTV 94% (17/18), 100% (1/1), 100% (6/6) e 69% (9/13), respectivamente e também dois cervos-dama, um cervos-nobre e quatro veados-catingueiros sorologicamente positivos para EHDV gera uma grande preocupação para conservação destas espécies, já que cervídeos costumam ter quadros bem severos destas doenças (Work *et al.* 1992; Stallknecht and Howerth, 2004; Maclachlan *et al.*, 2008; López-Olivera *et al.* 2010; Nol *et al.* 2010; Favero *et al.*, 2013; Lobato *et al.*, 2015; Bianchi *et al.*, 2017; OIE, 2018).

No presente estudo foi identificado que 100% (9/9) dos órix testados foram soropositivos para BTV e 50% (3/6) foram soropositivos para EHDV. Em um estudo anterior realizado com animais africanos que seriam importados para os EUA, foi identificado um animal desta espécie como soropositivo para BTV (House *et al.*, 1982). Este estudo anterior, em conjunto dos dados do presente estudo, levanta a possibilidade destes animais participarem do ciclo destes *Orbivirus*. Outros ruminantes africanos presentes no estudo também foram positivos para BTV, 50%(1/2) dos cobos-de-meia-lua e o elande testado, sendo ambos já relatados anteriormente como soropositivos para este vírus em diferentes artigos (House *et al.*, 1982; Hamblin *et al.*, 1990; More *et al.*, 2017; Caballero-Gómez *et al.*, 2021). Além dos relatos de ruminantes africanos soropositivos, eles parecem ser resistentes ao desenvolvimento de sinais clínicos pela infecção por *Orbivirus*, desta forma estes animais podem também agir como reservatórios para doenças como BTV e EHDV (Fernandez-Pacheco *et al.*, 2008; Mauroy *et al.*, 2008).

Foi identificado 83% (5/6) e 17%(1/6) das lhamas positivas para BTV e EHDV respectivamente. Isso condiz com dados anteriores que registraram estes animais sendo soropositivos para estas doenças. Alguns estudos anteriores relataram que eles podem ser resistentes ao desenvolvimento de sinais clínicos, sendo possíveis reservatórios, enquanto outros já descreveram casos de animais desta espécie vindo a óbito por infecções por BTV. Em ambos os casos esta é uma espécie que deve ter atenção especial em estudos envolvendo *Orbivirus* (Meyer *et al.*, 2009; Batten *et al.* 2011; Schulz *et al.* 2011).

Outro animal que foi descrito como possível reservatório de BTV é o camelo. Neste estudo obtivemos 40% (2/5) de indivíduos desta espécie soropositivos para BTV, levando ao questionamento sobre o papel destes animais na circulação de *Orbivirus*, já que em infecções experimentais foi comprovado que este animal pode desenvolver viremia, porém não há relatos clínicos de animais desta espécie naturalmente infectados (Batten *et al.* 2011; Schulz *et al.* 2011). O elefante testado também foi soropositivo para BTV e, apesar de não ser ruminante, já foi

relatada a possibilidade destes animais possuírem algum papel na transmissão de *Orbivirus* (Spickler, 2015; More *et al.*, 2017; England *et al.*, 2020; Caballero-Gómez *et al.*, 2021).

No presente estudo foi identificado uma anta soropositiva para BTV. Outro estudo também já identificou indivíduos dessa espécie como sorologicamente positivos, chegando a encontrar 91% de soropositividade nos animais testados, para BTV desta espécie no Cerrado brasileiro (Fernandes-Santos *et al.*, 2020). Esta espécie listada como vulnerável e é encontrada em todo o Brasil (Varela *et al.*, 2019). Além disto, foi observado que a anta foi a única espécie que foi soropositiva em um teste de BTV, amostras de 2017, e no teste seguinte, com amostra de 2019, foi negativa, mostrando que uma possível queda na quantidade de anticorpos, e este mesmo animal em um teste posterior, com amostra de 2020, foi novamente soropositiva, apresentando a possibilidade de ter ocorrido uma reinfeção ou contato com um novo sorotipo viral. Existem dúvidas de como este animal pode estar associado ao ciclo de transmissão de *Orbivirus* no Brasil, sendo necessário mais estudos para definir qual o papel desta espécie (May-Júnior, 2011; Fernandes-Santos *et al.*, 2020).

Não foram identificados nenhum rinoceronte nem hipopótamos soropositivos para nenhuma das doenças. E também pela grande diferença entre animais soropositivos para BTV e EHDV provavelmente não ocorreram reações cruzadas entre estes vírus, já que se tal fato estivesse presente seria observável proporções mais similares entre os animais soropositivos de ambos os vírus.

A quantidade de amostras coletadas em cada ano, bem como a soropositividade destas variou muito, como demonstrado pelo Quadro 11. Esta variação é devido ao protocolo de coleta de amostras do Zoológico, que somente realiza tais costas durante manejos de rotina ou quando há alguma emergência. Este procedimento visa reduzir o estresse gerado nos animais. Por meio da análise do quadro em questão é possível visualizar que em todos os anos houve pelo menos um animal soropositivo para BTV e em mais da metade dos anos houve pelo menos um animal sorologicamente positivo para EHDV. Além disto, é possível visualizar que os anos de 2015 e 2016 foram o com maior número de animais soropositivos para EHDV. O ano de 2012 foi o com maior número total de animais sorologicamente positivos para BTV e 2016 foi o ano com o maior percentual de animais soropositivos para BTV (7/8).

Pela proporção de animais soropositivos para BTV em comparação com os para EHDV é possível que o BTV esteja circulando mais na região do FPMZB-BH, apesar de não sabermos quais os sorotipos circulantes. Devido ao grande número de animais soropositivos, é possível que estes sorotipos podem ser pouco patogênicos, permitindo que os animais não apresentem sinais clínicos. O alto número de animais soronegativos para EHDV também gera uma preocupação por representar animais suscetíveis à infecção por este vírus. Ao avaliar os Quadros 8, 9 e 10 é possível visualizar que houveram animais soronegativos em um teste e se tornaram soropositivos tanto para EHDV, no caso um órix, quanto para BTV, um cervo-dama e uma anta, sinalizando que provavelmente estes animais foram infectados dentro do zoológico. Desta forma sendo necessário realizar exames dos animais destinados ao zoológico pelo ICMBio, como requerida pela IN23 de 2014, antes de serem introduzidos aos recintos, de forma a evitar a introdução de novos sorotipos e a entrada de animais imunodeficientes que podem vir a se infectarem neste ambiente, e também nos casos de soltura dos animais que foram abrigados na FPMZB-BH, evitando a introdução de orbivirose em outros ambientes.

## 5.2. Testes moleculares em animais vivos e necropsiados

Foram recebidas amostras de sangue em EDTA de animais que eram submetidos a algum manejo de rotina no zoológico. As amostras de dois veados-catingueiros, dois cervos-dama, um cervo-do-pantanal e um órix. Estas amostras de sangue foram centrifugadas e o soro era retirado, para ser submetido aos testes de IDGA, e as hemácias foram lavadas. O material genético das amostras de hemácias lavadas foi extraído pelo método de *Trizol*®. As amostras extraídas foram submetidas à qRT-PCR para BTV e para EHDV. Todas as amostras foram negativas para ambos os testes, representando que estes animais não estavam virêmicos. Nenhum destes animais apresentava sinais clínicos sugestivos de doença hemorrágica, porém todos os cervos-dama e dois dos veados-catingueiros eram soropositivos para BTV e um veado-catingueiro era soropositivo para EHDV, como é possível visualizar no Quadro 12.

Também foram recebidas 3 amostras de animais que vieram a óbito no zoológico durante o período do estudo, 2021 e 2022, dois veados-catingueiros e um cervo-do-pantanal. O material

genético das amostras foi extraído pelo método de *Trizol*®. Todas as amostras foram submetidas ao qRT-PCR para BTV e para EHDV e deram resultados negativos. Demonstrando que nenhum dos animais veio a óbito por infecção de *Orbivirus*. É importante ressaltar que nenhum dos animais apresentavam sinais específicos de doenças hemorrágicas, sendo testados principalmente por terem alguns sinais sugestivos e por serem espécies de interesse para estudos relacionados a *Orbivirus*. Ambos os veados-catingueiros eram soropositivos para BTV, demonstrando que eles já tiveram contato anterior com este vírus mas debelaram a infecção.

Quadro 12: Comparação entre os animais testados pelo qRT-PCR e pelo IDGA para BTV e para EHDV.

Espécie		Data da coleta	ID	Amostra	Resultado qRT-PCR BTV	Resultado qRT-PCR EHDV	Resultado IDGA BTV		Resultado IDGA EHDV	
Nome comum	Nome científico						Positivos	Total	Positivos	Total
Veado-catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	27/01/2022	279940 (VC270122)	hemácias lavadas, pulmão, linfonodo, pool (baço, fígado e coração)	Negativo	Negativo	1	1	0	1
Veado-catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	01/02/2022	908471	hemácias lavadas	Negativo	Negativo	1	1	1	1
Veado-catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	15/02/2022	VC010222	pulmão, linfonodo, pool (baço, fígado e coração)	Negativo	Negativo	1	1	0	1
Cervo-dama	<i>Dama</i>	25/02/2022	CD200222	hemácias lavadas	Negativo	Negativo	1	1	0	1
Cervo-dama	<i>Dama dama</i>	06/04/2022	CD0604	hemácias lavadas	Negativo	Negativo	1	1	0	1

### 5.3. *Culicoides*

Com a possibilidade da circulação de BTV e EHDV no Jardim Zoológico de Belo Horizonte foi levantada a necessidade de se estudar melhor os vetores de BT e EHD neste espaço. Foi planejado a realização de capturas de insetos, seguida pela identificação morfológica dos *Culicoides* por espécie, gênero e caso fosse fêmea, estágio gonadotrófico. Sendo esta, a primeira captura de *Culicoides* em um zoológico no Brasil. Além disto as fêmeas que se encontravam ingurgitadas foram submetidas a PCR para a análise da preferência alimentar de algumas espécies destes insetos.

#### 5.3.1. Coletas dos *Culicoides*

No total foram realizadas 25 coletas de *Culicoides*. Algumas das informações anotadas estão representadas no Quadro 13.

Quadro 13: Informações por dia de coleta de *Culicoides* na FPMZB-BH.

ID	Data da coleta	Mês da coleta	Pôr do sol	Nascer do sol	temp. máx. (°C)	temp. mín. (°C)	temp. méd. (°C)	umi. máx. (%)	umi. Min. (%)	Estação da lua	Lum. da lua	Chuva no dia	Pressão atm. Méd. (hPa)	Total de maruins
----	----------------	---------------	------------	---------------	-----------------	-----------------	-----------------	---------------	---------------	----------------	-------------	--------------	-------------------------	------------------

Z1	09/12-10/12	Dez	18:28	05:09	28.1	19.6	23.8	87	45	Crescente	39	N	1014	25
Z2	20/12-21/12	Dez	18:34	05:13	28.9	20.9	24.9	86	53	Minguante convexa	99	N	1014	38
Z3	04/01-05/01	Jan	18:39	05:22	32.9	21.5	27.7	99	45	Crescente	6	S	1012	14
Z4	19/01-20/01	Jan	18:40	05:32	34.2	23.1	28.7	80	38	Minguante convexa	96	N	1019	128
Z5	02/02-03/02	Fev	18:38	05:41	27.4	21.5	24.5	99	69	Crescente	1	N	1015	52
Z6	24/02-25/02	Fev	18:28	05:51	25.3	21.4	23.4	99	77	Minguante	39	N	1018	189
Z7	10/03-11/03	Mar	18:15	05:56	33.9	22.8	28.4	75	20	Quarto crescente	50	N	1020	30
Z8	24/03-25/03	Mar	18:03	06:00	29.6	21.9	25.8	81	52	Minguante convexa	61	N	1020	37
Z9	06/04-07/04	Abr	17:51	06:04	32.9	24	28.5	76	41	Crescente	23	N	1018	9
Z10	20/04-21/04	Abr	17:40	06:08	32.1	19	25.1	82	32	Minguante convexa	82	N	1018	4
Z11	05/05-06/05	Mai	17:31	06:13	26.6	18.2	22.4	99	72	Crescente	23	N	1019	10
Z12	18/05-19/05	Mai	17:26	06:18	21.8	8.2	15	74	27	Minguante convexa	94	N	1015	0
Z13	01/06-02/06	Jun	17:23	06:24	29.6	17.7	23.7	99	45	Crescente	4	N	1019	2
Z14	15/06-16/06	Jun	17:24	06:28	25.8	11.3	18.6	99	39	minguante convexa	98	N	1019	1
Z15	28/06-29/06	Jun	17:27	06:31	25.8	10.9	18.4	91	40	nova	0	N	1021	0
Z16	13/07-14/07	Jul	17:32	06:31	29.2	16.3	22.8	83	29	minguante convexa	98	N	1023	2
Z17	27/07-28/07	Jul	17:37	06:27	28.9	12.9	20.9	85	30	lua minguante	1	N	1022	1
Z18	10/08-11/08	Ago	17:41	06:20	26.3	13.5	19.9	68	43	lua crescente	99	n	1020	0
Z19	25/08-26/08	Ago	17:45	06:09	29.6	18	23.8	73	34	lua minguante	1	n	1025	3
Z20	05/09-06/09	Set	17:48	05:59	29.6	18	23.8	71	39	quarto crescente	72	n	1026	0
Z21	22/09-23/09	Set	17:51	05:44	27.5	20.3	23.9	91	63	lua minguante	9	s	1015	0
Z22	06/10-07/10	Out	17:55	05:31	33.9	20.5	27.2	91	41	lua crescente	89	n	1018	9
Z23	19/10-20/10	Out	17:59	05:21	32.5	21.5	27	81	37	lua minguante	31	s	1019	2
Z24	03/11-04/11	Nov	18:05	05:12	21	16.4	18.7	75	65	quarto crescente	72	s	1022	3
Z25	17/11-18/11	Nov	18:14	05:07	32.9	19.9	26.4	73	41	lua minguante	31	n	1020	9

Ao todo foram capturados 568 espécimes de *Culicoides* de diferentes espécies discutidas em mais detalhes à frente.

Ao final da coleta de todos os dados, foram feitas análises estatísticas em relação às possíveis variáveis que poderiam ter afetado as coletas e foi montada uma tabela com a análise univariada e multivariada para cada variável (Quadro 14).

Quadro 14: Análise univariada e multivariada do Índice de Risco Relativo (IRR) de diferentes variáveis que podem ter afetado a quantidade de *Culicoides* em cada coleta.

Variável	Análise univariada		Análise multivariada	
	IRR (95%)	Valor de p	IRR (95%)	Valor de p
Temperatura máxima	1.01 (0.92 - 1.22)	0.778	-	-
Temperatura mínima	1.69 (1.47 - 1.94)	0.000*	-	-
Temperatura média	1.26 (1.09 - 1.46)	0.002*	-	-
Faixas de temperatura	15 a 20°C	4.5 (0.30 - 66.42)	-	-
	25.1 a 30°C	83.7 (9.30 - 752.96)	-	-
Umidade máxima	1.06 (1.01 - 1.10)	0.007*	-	-

Continuação Quadro 14.

Umidade mínima	1.04 (1.01 - 1.06)	0.001*	-	-
----------------	--------------------	--------	---	---

<b>Umidade média</b>		1.04 (1.01 - 1.07)	0.002*	-	-
<b>Estação da lua</b>		1.77 (0.83 - 3.75)	0.138	-	-
<b>Taxa da luminosidade da lua</b>		1.00 (0.99 - 1.02)	0.416	-	-
<b>Coletas em dias sem chuva (Precipitação)</b>		5.44 (1.89 - 15.66)	0.002*	5.18 (2.00-13.42)	0.001*
<b>Armadilhas armada fora do recinto em comparação com as dentro dos recintos</b>		2.34 (1.07 - 5.12)	0.034*	-	-
<b>Fontes de água próximo à armadilhas</b>		2.70 (1.03 - 7.08)	0.044*	-	-
<b>Vegetação próxima</b>		0.99 (0.38 - 2.57)	0.979	-	-
<b>Localização das armadilhas **</b>	1	5.47 (1.59 - 18.85)	0.007*	-	-
	3	1.75 (0.50 - 6.13)	0.381	-	-
	4	1.08 (0.30 - 3.85)	0.902	-	-
	5	3.44 (1.00 - 11.92)	0.051*	-	-
	6	2.86 (0.82 - 9.92)	0.098	-	-
<b>Presença de acúmulo de fezes próximas à armadilhas</b>		3.07 (1.50 - 6.30)	0.002*	2.56 (1.57-4.18)	0.000*
<b>Mês do ano ***</b>	Janeiro	68.51 (15.95 - 294.18)	0.000*	92.65 (22.30 - 384.92)	0.000*
	Fevereiro	120.50 (28.18-515.31)	0.000*	116.3 (29.47 - 459.17)	0.000*
	Março	33.50 (7.72 - 145.30)	0.000*	31.17 (7.77 - 125.06)	0.000*
	Abril	6.50 (1.38 - 30.51)	0.018*	6.05 (1.38 - 16.55)	0.017*
	Maio	5.00 (1.04 - 24.15)	0.045*	5.24 (1.15 - 23.75)	0.032*
	Julho	1.50 (0.24 - 9.42)	0.665	1.50 (0.25 - 8.98)	0.654
	Agosto	1.50 (0.24 - 9.42)	0.665	1.41 (0.24 - 8.44)	0.703
	Setembro	1.42 (0)	0.982	1.14 (0)	0.992
	Outubro	5.50 (1.15 - 26.27)	0.033*	9.54 (1.99 - 45.55)	0.005*
	Novembro	6.00 (1.27 - 28.39)	0.024*	12.50 (2.61 - 59.79)	0.002*
Dezembro	31.00 (7.14 - 134.67)	0.000*	30.62 (7.61 - 123.23)	0.000*	

\* Resultados significativos  $p < 0,05$ .

\*\* A armadilha 2 foi utilizada para a comparação entre todas as armadilhas por ser a com menor número de *Culicoides* capturados, assim sendo omitida da tabela.

\*\*\* Junho foi utilizado para comparar os meses, desta forma foi omitido da tabela.

Ao observar os dados das análises de Índice de Risco Relativo (IRR) é possível visualizar que muitas variáveis afetaram as coletas na análise univariada, mas quando foram inseridas na análise multivariada não apresentaram tanta relevância. Alguns fatores que mostraram ser mais importantes nas análises univariadas durante as coletas foram a temperatura, a umidade, a

precipitação, a localização das armadilhas, a presença de acúmulo de fezes próximo às armadilhas e a data da coleta. Já nas análises multivariadas os dados que continuaram sendo relevantes foram a precipitação, a presença de acúmulo de fezes próximo às armadilhas e a data da coleta.

A variação entre os dados da análise univariada e multivariada se dá devido à associação dos mesmos não sendo possível compará-los de forma independente. A temperatura e umidade estão muito associadas à data em que foram realizadas as coletas. Desta forma estes dados podem ter interferido com as análises multivariadas. Da mesma forma, a presença de acúmulo de fezes próximo às armadilhas está associada com a localização das armadilhas.

Em relação às análises univariadas, a temperatura e a umidade demonstraram ser muito relevantes, o que é explicado pelo ciclo de vida dos *Culicoides* que se reproduzem melhor e são mais ativos durante épocas de maior temperatura e umidade, em especial no período do verão, dado também indicado pela tabela com o maior risco para captura desses insetos neste período. A presença de precipitação pluviométrica também coincidiu com o período de verão demonstrando uma relação entre este fator e a época do ano (Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Tweedle and Mellor, 2002; Veronesi *et al.*, 2009). A temperatura e a umidade média representam a média das temperaturas e umidades de todas as armadilhas no momento em que elas eram armadas e, como é possível visualizar, a escolha do dia para colocar as armadilhas é extremamente importante, isto é refletido também por um maior número de insetos serem capturados em dias sem chuva. Como os *Culicoides* são insetos pequenos, chuvas fortes, principalmente com vento, atrapalham o voo deles, impactando negativamente nas coletas. A faixa média de temperatura foi feita com base na temperatura média e, é possível perceber que, entre 25.1 a 30°C existe um maior número de *Culicoides*, sendo explicado pelo comportamento destes insetos que estão mais ativos em temperaturas maiores (Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Tweedle and Mellor, 2002; Veronesi *et al.*, 2009)

Os *Culicoides* realizam repasto e se reproduzem em locais com acúmulo de fezes e outros tipos de matérias orgânicas, desta forma demonstrando a importância deste fator (Mellor *et al.*, 2000). Outro fator relacionado às armadilhas é a presença de fontes de água próximas, que auxiliam na reprodução destes insetos. Foi também identificado que a colocação das armadilhas fora dos recintos possui uma importância para a uma maior captura de maruins. Este fator pode estar relacionado com o comportamento dos maruins por serem considerados exofágicos, que se alimentam em ambientes abertos, e exofilicos, que vivem em locais abertos, havendo algumas variações entre as espécies (Baldet *et al.*, 2008). O conjunto dos fatores da presença de acúmulo de fezes próximo às armadilhas, presença de fontes de água e a localização das armadilhas em relação aos recintos, em conjunto com o hospedeiro mais próximo de cada armadilha fizeram com que o índice de coleta de *Culicoides* variasse entre as diferentes armadilhas, sendo a A1 com a maior coleta e a A2 com a menor. A A2 foi utilizada para a comparação entre o risco de cada armadilha por ser a com menor coleta de maruins e por isto não aparece na tabela. Apesar destes diferentes fatores que podem ter afetado a quantidade de *Culicoides* de cada armadilha, detalhes específicos em relação aos locais em que estes insetos se reproduzem ainda é muito escassa, não existindo dados específicos sobre os substratos de preferência de que cada espécie utiliza para se reproduzir, isto é, devido ao método de coleta de maruins utilizado que somente permite adquirir dados sobre a população de adultos, sendo necessário o uso de outras técnicas para avaliar os diferentes estágios de desenvolvimento destes insetos (Werner *et al.*, 2020)

Com os dados da variação do número de *Culicoides* das coletas em cada mês foi possível observar que nos meses quentes e úmidos, como o mês de fevereiro, houve 120 vezes mais *Culicoides* coletados que nos meses de clima frio e seco como setembro, demonstrado na Figura 4. Junho foi utilizado para a comparação do risco entre os meses, por isto não está presente no quadro. Devido a maior captura de maruins nos meses quentes e que o PIE é diretamente afetado pela temperatura ambiente, além de que foi visualizada a circulação de BTV e EHDV no zoológico, é mais provável que animais sejam infectados nos meses quentes e úmidos, sendo necessário medidas de controle focadas nesta época.

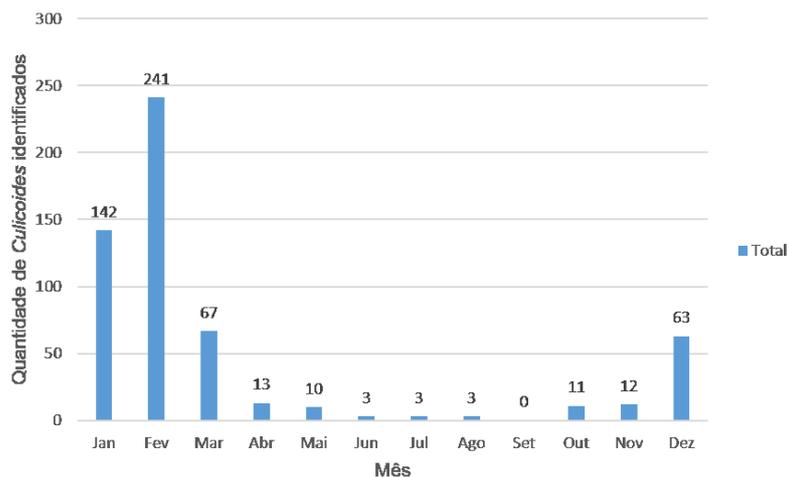


Figura 4: Gráfico do total de *Culicoides* coletados na FPMZB-BH para cada mês do projeto.

A partir dos resultados obtidos na análise multivariada, baseado nos fatores de risco obtidos, foi montado um gráfico da média preditiva de *Culicoides* que podem ser coletados em cada mês (Figura 5). Este gráfico permite que, ao se basear nos dados obtidos na coleta, seja possível realizar previsões de como as próximas coletas na FPMZB-BH se comportarão. Por este gráfico é possível perceber que os meses de janeiro e fevereiro possuíram uma média preditiva significativamente superior aos outros meses do ano. Isto demonstra que os meses de verão possuem uma possibilidade de coleta de *Culicoides* superior aos outros, representando um maior risco para a transmissão de BTV e EHDV. Também é possível visualizar que os meses de inverno tendem a ter futuras coletas, de maruins, próximas, mostrando que nesta época existem poucos vetores circulando e uma menor chance de ocorrer a transmissão de *Orbivirus*.

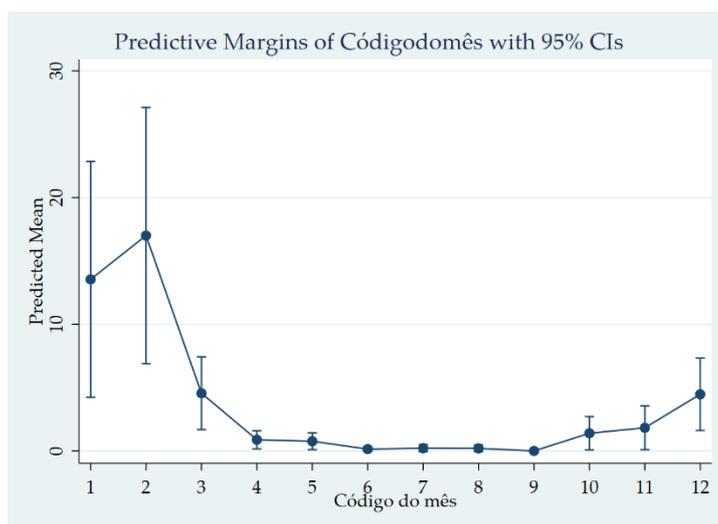


Figura 5: Gráfico das médias preditivas das coletas de *Culicoides* na FPMZB-BH para cada mês do projeto.

A tabela de IRR, o gráfico do total coletado para cada mês e o das médias preditivas para cada mês, mostraram que a data de coleta é extremamente importante na quantidade de insetos coletados. Essa informação é corroborada por outros trabalhos feitos em zoológicos e em diferentes regiões do Brasil, que relataram que em períodos quentes e úmidos, relativos ao período do verão, é possível capturar uma grande quantidade de maruins, já em épocas frias e secas, período de inverno, esta quantidade reduz muito. Em algumas coletas feitas em meses de inverno não foi possível coletar nenhum *Culicoide* (Laender *et al.*, 2004; Farias *et al.*, 2020; Santarém & Felipe-Bauer, 2016; Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Borkent & Dominiak, 2020;

Lobato *et al.*, 2015; Ruder *et al.*, 2015; England *et al.*, 2020; Labuschagne *et al.*, 2007). Demonstrando um maior risco para a transmissão de BTV e EHDV nos meses de verão, devido ao maior número de vetores (Mellor *et al.*, 2000). Sendo recomendado o uso de medidas que previnam a transmissão destas doenças como uso de telas, inseticidas e repelentes (Tweedle and Mellor, 2002; MacLachlan *et al.*, 2015; Lobato *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Spickler, 2019; Saminathan *et al.*, 2020; WOA, 2019a, b).

Também foi feita uma análise mais detalhada de como a localização de cada armadilha afetou as coletas. A quantidade de *Culicoides* coletados por cada armadilha está representada na Figura 6. Como é possível visualizar a A1 foi a que teve maior quantidade de maruins coletados, seguida pela A5. A A6 foi a terceira melhor, estando bem similar à A5. A A3 foi a quinta melhor. As A2 e A4 capturaram um número similar de insetos.

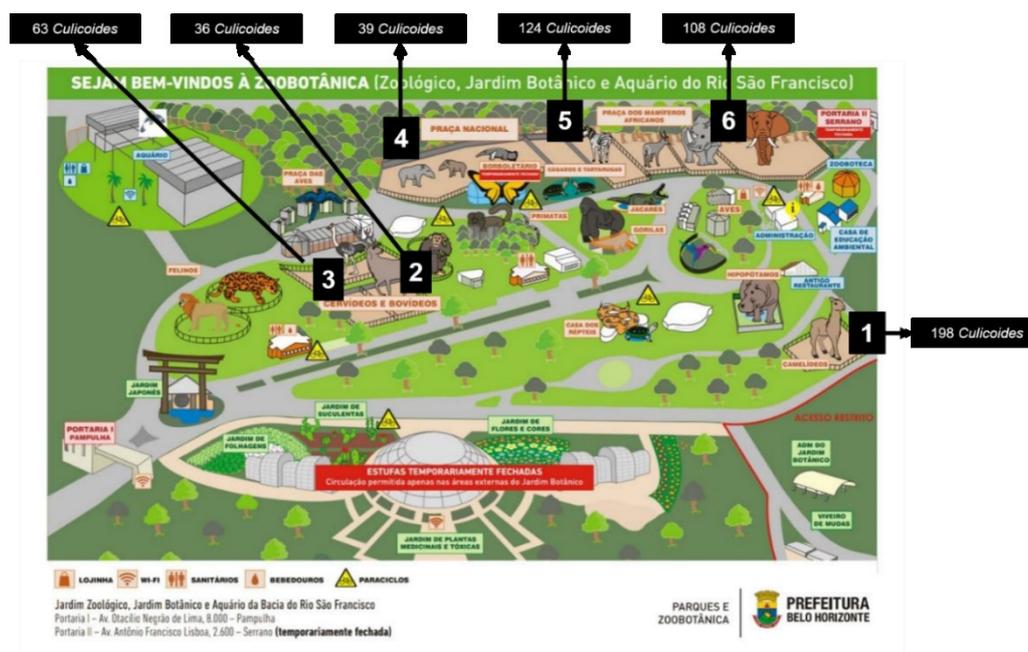


Figura 6: Total de *Culicoides* coletados por armadilha.

Foi também montado um gráfico da média preditiva das coletas de *Culicoides* para cada localização das armadilhas (Figura 7). Foi utilizada a mesma metodologia que, ao utilizar os fatores de risco identificados no estudo, é feita uma predição da quantidade de insetos que serão coletados em cada localização das armadilhas em coletas futuras. Este gráfico mostra que ao analisar a média preditas de todas as coletas, a A1 pode apresentar uma quantidade média de *Culicoides* coletados significativamente superior à A2 e A4 em coletas futuras. Ao realizar a comparação da A1 com a A3, A5 e A5 não é possível dizer que a média foi significativamente diferente entre elas, assim futuras coletas podem ter quantidades de insetos capturados semelhantes entre estas armadilhas. Além disso, ao comparar a média predita da A2, A3, A4, A5 e A6 não é possível dizer que houve uma diferença significativa entre elas. Desta forma, não é possível dizer que a A1 continuará com a maior coleta entre todas as armadilhas, mas é provável que ela tenha coletas superiores à A2 e A4.

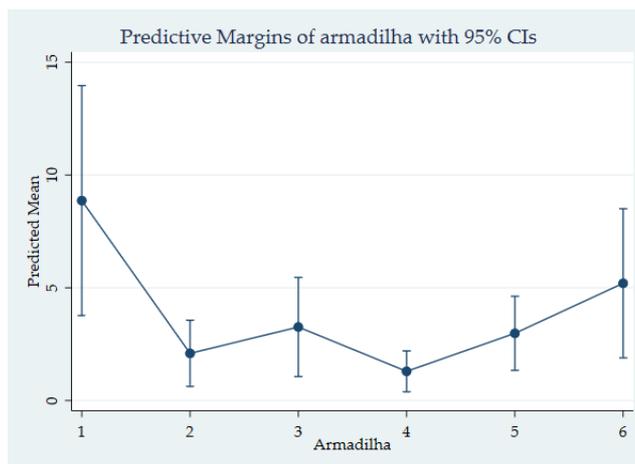


Figura 7: Gráfico da comparação entre as médias preditas das coletas de *Culicoides* para cada armadilha utilizada na FPMZB-BH.

England *et al.* (2020) identificaram que em recintos próximos a camelos e lhamas, assim como próximos a elefantes, no caso elefante-asiático (*Elephas maximus*), foi possível capturar uma grande quantidade de *Culicoides*. Vilar *et al.* (2015) também relataram essa associação entre camelos e a captura de grandes quantidades de *Culicoides*, sendo a armadilha próxima a estes animais a com a segunda melhor captura, atrás somente da armadilha próxima a zebra-de-Grevy (*Equus grevyi*) e o órix-de-cimitarra (*Oryx dammah*).

Ao observarmos os fatores de risco da A1, é possível perceber que ela possuía todos os principais fatores de risco detectados na análise univariada, como presença de acúmulo de fezes próximo às armadilhas, fontes de água próximas e estava fora do recinto. Outro fator que pode ter influenciado o número de insetos coletados por esta armadilha, bem como a A6, pode ser os hospedeiros próximos. Em pesquisas anteriores foi identificado que a presença de camelos próximo aos locais das armadilhas era um dos possíveis fatores que podiam levar a um aumento nas coletas nestes locais (Vilar *et al.*, 2015; England *et al.*, 2020). England *et al.* (2020) identificaram que em recintos próximos a camelos e lhamas, assim como próximos a elefantes, no caso elefante-asiático (*Elephas maximus*), foi possível capturar uma grande quantidade de *Culicoides*. Vilar *et al.* (2015) também relataram essa associação entre camelos e a captura de grandes quantidades de *Culicoides*, sendo a armadilha próxima a estes animais a com a segunda melhor captura, atrás somente da armadilha próxima a zebra-de-Grevy (*Equus grevyi*) e o órix-de-cimitarra (*Oryx dammah*). Assim, o hospedeiro próximo pode ser um dos motivos que a A1, próxima ao camelo, e a A6, próxima ao elefante, conseguiram capturar um uma grande quantidade de *Culicoides*. Também já foram descritas infecções experimentais de camelos por *Orbivirus*, demonstrando que este animal pode desenvolver viremia (Batten *et al.*, 2011; Schulz *et al.*, 2012). Apesar destes relatos, não há dados de casos clínicos nestas espécies. É possível que um maior número de insetos seja coletado próximos a camelos e elefantes pela maior quantidade de fezes que estes animais produzem devido ao seu tamanho, o que leva a um acúmulo de matéria orgânica, que é um fator importante para a reprodução dos *Culicoides*, sendo um fator também especulado por England *et al.* (2020). Além disso, o tamanho destes animais também permitiria que um maior número de insetos se alimentassem ao mesmo tempo, sem que houvesse competição por espaço, assim permitindo a presença de uma população maior de maruins se alimentando durante o mesmo período. Animais maiores costumam ser menos ativos, assim permitindo que os vetores realizem o repasto por períodos mais longos. Devido a estes diferentes dados, existe a possibilidade de que camelos e elefantes tenham algum papel no ciclo de *Orbivirus*.

Este maior número de *Culicoides* na A1 e A6 pode representar um maior risco dos animais próximos a elas, como o camelo, lhama e elefante, serem picados. Estes animais já foram identificados com anticorpos contra *Orbivirus*, porém a doença clínica é rara. Para a prevenção de doenças hemorrágicas no zoológico é recomendável manter afastadas as espécies sensíveis à BTV e EHDV, como os cervídeos, camelos e elefantes, já que aparentemente a presença destas espécies está associada a um maior número de maruins. Além disto, para controle destes insetos e de outros é recomendável não manter acúmulo de fezes próximas aos recintos, já que este é um local propício para a reprodução de diferentes vetores. Durante os períodos de verão,

é recomendável o uso de telas para insetos, inseticidas e repelentes para reduzir o repasto de *Culicoides*, especialmente no caso dos Cervídeos (MacLachlan *et al.*, 2015; Lobato *et al.*, 2015; Spickler, 2015; Spickler, 2019; Saminathan *et al.*, 2020; Vilar *et al.*, 2015; England *et al.*, 2020).

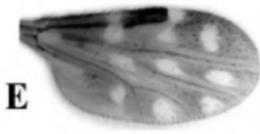
Durante o período das coletas alguns animais vieram a óbito, o que pode ter interferido no número total de *Culicoides*. No dia 24 de setembro de 2022 a zebra morreu, no dia 31 de agosto do mesmo ano, o camelo e no início de setembro, o cobo-de-meia-lua. Todas as três mortes foram avaliadas por necropsia e histopatologia e nenhuma foi associada à possibilidade de ter sido devido a doença hemorrágica. Desta forma, não foi necessária a realização de qRT-PCR para diagnóstico de doenças causadas por *Orbivirus*. Estas mortes podem ter tido algum efeito na quantidade total de *Culicoides* coletados, bem como na quantidade individual de cada armadilha já que no zoológico só havia um exemplar de cada uma destas espécies e após o óbito os recintos permaneceram vazios até o final das coletas.

### 5.3.2. Identificação morfológica dos *Culicoides*

As identificações morfológicas dos *Culicoides* coletados foram feitas de acordo com diferentes chaves de identificação avaliando os padrões de pigmentação das asas com estereoscópio (Farias, 2014; Castellón & Veras, 2015; Farias, Almeida & Pessoa, 2016; Santarém & Felipe-Bauer, 2016; Borkent & Dominiak, 2020; Rios *et al.* 2021). Após a identificação da espécie ou grupo, foi feita a identificação do gênero seguida pela identificação do estágio gonadotrófico de cada indivíduo caso fosse uma fêmea (Harrup 2014; Larska *et al.*, 2017).

Além dos *Culicoides* já previamente descritos em Minas Gerais representados no Quadro 3 também foi encontrado o *C. debilipalpis* Lutz, 1913, com seu padrão de asa apresentado no Quadro 15.

Quadro 15: Padrão de asa do *C. debilipalpis* Lutz, 1913.

Subgenero/grupo	Espécie	Padrão de asa	Referência
<i>Haematomyidium</i> Goeldi, 1905	<i>Culicoides</i> <i>debilipalpis</i> Lutz, 1913		Farias, Almeida & Pessoa, 2016

Os Quadros 16 e 17 apresentam o total de *Culicoides* identificados até o nível de espécie e os identificados somente até o nível de grupo, respectivamente. As informações de cada uma das espécies e grupos identificados foram agrupadas em quadros para melhor visualização (Quadro 18) e o total está apresentado na Figura 8. Também foi montado um quadro (Quadro 19) com as informações dos insetos capturados por armadilhas e outro com as informações relativas aos meses (Quadro 20). E a variação da quantidade de *Culicoides* por mês pode ser observada na Figura 9.

Quadro 16: Total de *Culicoides* identificados até o nível de espécie.

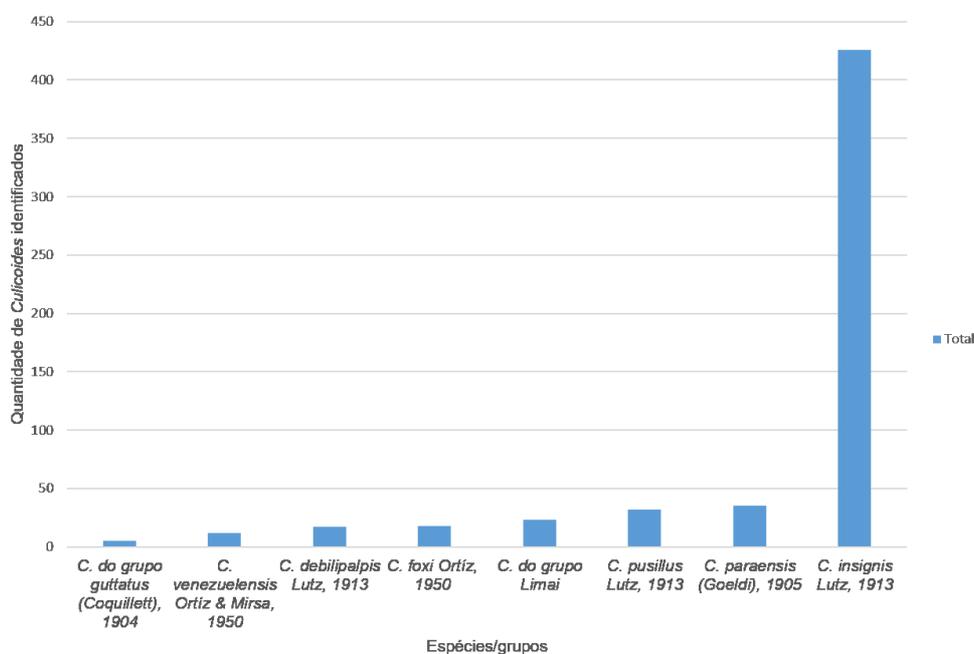
Espécie	Total
<i>Culicoides venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa, 1950	12
<i>Culicoides debilipalpis</i> Lutz, 1913	17
<i>Culicoides foxi</i> Ortíz, 1950	18
<i>Culicoides pusillus</i> Lutz, 1913	32
<i>Culicoides paraensis</i> (Goeldi), 1905	35
<i>Culicoides insignis</i> Lutz, 1913	426

Quadro 17: Total de *Culicoides* identificados até grupo.

Grupo	Total
<i>Culicoides</i> do grupo <i>guttatus</i> (Coquillett), 1904	5
<i>Culicoides</i> do grupo Limai	22

Quadro 18: Informações sobre espécies e grupos de *Culicoides* em relação ao estágio gonadotrófico, coletados na FPMZB-BH durante o período de dezembro de 2021 a novembro de 2022.

Espécie	Macho	Nulípara	Ingurgitada	Gravídica	Parida	Total
<i>Culicoides</i> do grupo <i>guttatus</i> (Coquillett), 1904	0	2	1	0	2	5
<i>Culicoides venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa, 1950	0	1	0	2	9	12
<i>Culicoides debilipalpis</i> Lutz, 1913	8	0	3	0	6	17
<i>Culicoides foxi</i> Ortíz, 1950	1	0	0	0	17	18
<i>Culicoides</i> do grupo <i>Limai</i>	4	8	3	1	7	23
<i>Culicoides pusillus</i> Lutz, 1913	7	5	5	1	14	32
<i>Culicoides paraensis</i> (Goeldi), 1905	2	4	6	1	22	35
<i>Culicoides insignis</i> Lutz, 1913	5	136	42	22	221	426

Figura 8: Total de *Culicoides* por espécies e grupos identificados.

Quadro 19: Informações das espécies e grupos de *Culicoides* coletados na FPMZB-BH durante o período de dezembro de 2021 a novembro de 2022 em relação a cada armadilha utilizada.

<b>Espécie</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>	<b>Total</b>
<i>Culicoides</i> do grupo <i>guttatus</i> (Coquillett), 1904	0	3	0	0	2	0	<b>5</b>
<i>Culicoides venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa, 1950	0	1	1	0	1	9	<b>12</b>
<i>Culicoides debilipalpis</i> Lutz, 1913	0	2	3	1	3	8	<b>17</b>
<i>Culicoides foxi</i> Ortíz, 1950	0	5	6	1	2	4	<b>18</b>
<i>Culicoides</i> do grupo <i>Limai</i>	14	0	4	3	1	1	<b>23</b>
<i>Culicoides pusillus</i> Lutz, 1913	10	4	3	0	4	11	<b>32</b>
<i>Culicoides paraensis</i> (Goeldi), 1905	6	1	2	12	6	8	<b>35</b>
<i>Culicoides insignis</i> Lutz, 1913	168	20	44	22	105	67	<b>426</b>
<b>Total</b>	<b>198</b>	<b>36</b>	<b>63</b>	<b>39</b>	<b>124</b>	<b>108</b>	<b>568</b>

Quadro 20: Informações das espécies e grupos de *Culicoides* coletados na FPMZB-BH durante o período de dezembro de 2021 a novembro de 2022 em relação a cada um dos meses das coletas.

<b>Espécie</b>	<b>Jan</b>	<b>Fev</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>Mai</b>	<b>Jun</b>	<b>Jul</b>	<b>Ago</b>	<b>Set</b>	<b>Out</b>	<b>Nov</b>	<b>Dez</b>	<b>Total</b>
<i>Culicoides</i> do grupo <i>guttatus</i> (Coquillett), 1904	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	5
<i>Culicoides venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa, 1950	2	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	5	12
<i>Culicoides debilipalpis</i> Lutz, 1913	0	4	0	0	0	0	0	0	0	7	5	1	17
<i>Culicoides foxi</i> Ortíz, 1950	1	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
<i>Culicoides</i> do grupo <i>Limai</i>	5	6	3	4	0	0	0	0	0	0	1	4	23
<i>Culicoides pusillus</i> Lutz, 1913	20	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	32
<i>Culicoides paraensis</i> (Goeldi), 1905	18	6	3	1	0	0	2	0	0	2	1	2	35
<i>Culicoides insignis</i> Lutz, 1913	96	205	49	9	10	3	1	1	0	0	5	47	426
<b>Total</b>	<b>142</b>	<b>241</b>	<b>67</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>62</b>	<b>568</b>

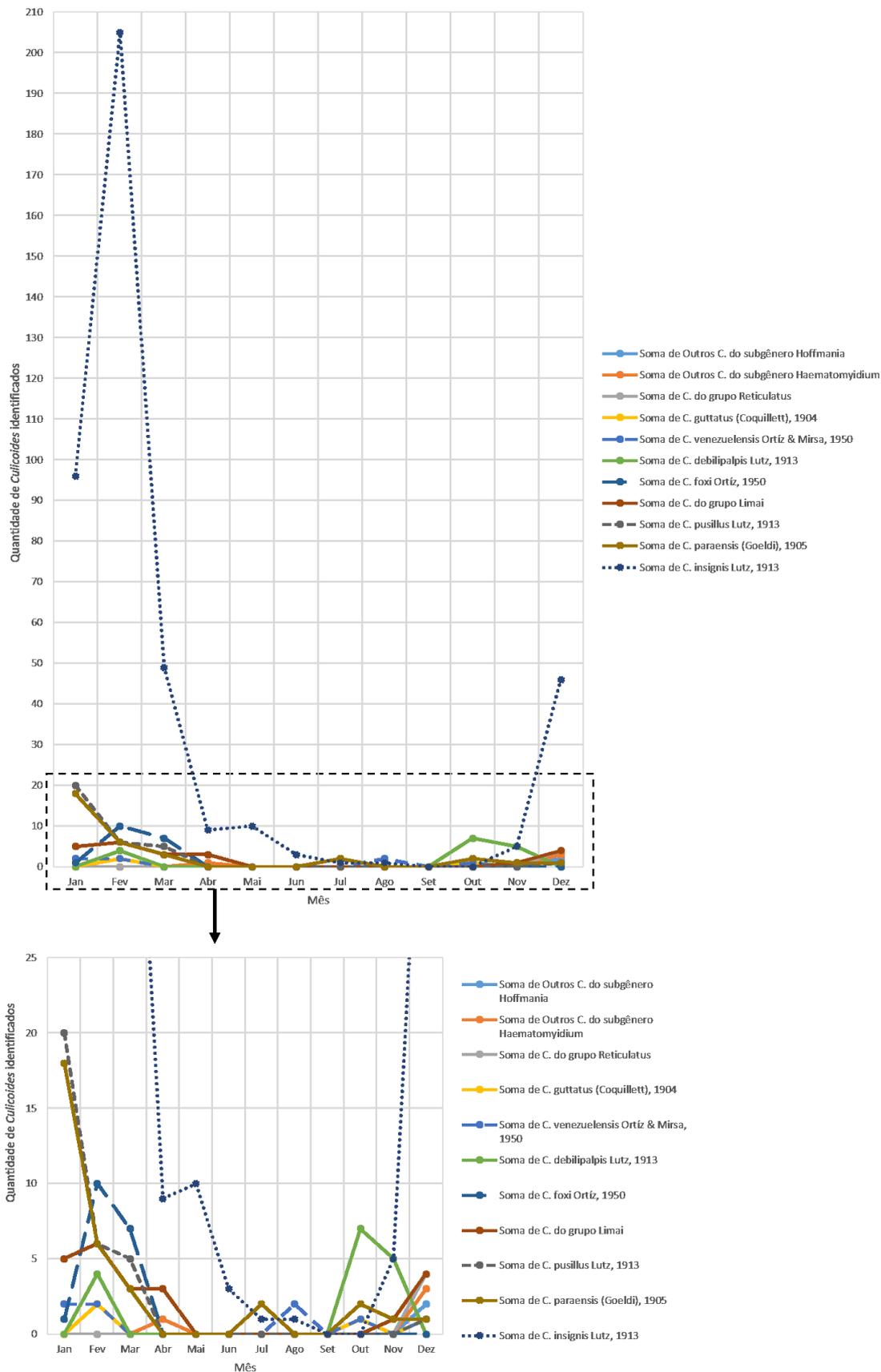


Figura 9: Variação da quantidade de *Culicoides* de cada espécie e grupo capturados, segundo mês de captura.

Como é possível visualizar nos quadros e figuras acima, *C. insignis* foi a espécie mais encontrada nas coletas. Também foi a mais encontrada em todas as armadilhas e em todos os meses, com exceção do período de inverno, junho a setembro. Esta informação corrobora o estudo realizado por Laender *et al.* (2004) que identificaram esta espécie sendo a mais prevalente no estado de Minas Gerais. Carvalho & Silva (2014) em seu estudo no Maranhão também identificaram que o *C. insignis* era a mais encontrada, havendo uma predominância desses insetos em locais com mamíferos como currais e pocilgas. A segunda espécie mais encontrada foi o *C. pusillus*, o que gera uma preocupação, já que esta, em conjunto com o *C. insignis*, são identificados como os possíveis transmissores de BTV e EHDV na América do Sul (Mellor, Boorman & Baylis, 2000). Desta forma, foi possível identificar os dois principais vetores que esta pesquisa tem foco.

Outra espécie muito encontrada foi *C. paraensis* (Goeldi), 1905. Esta espécie é a transmissora do Vírus Oropouche na América Latina. Além disto, esta espécie também pode transmitir *Bunyavirus Ananindeua* para aves e mamíferos e *Mansonella ozzardi* e sua saliva pode gerar dermatite alérgica. (Romaña & Wygodzinsky, 1950; Sherlock & Guitton, 1965; Borkent, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2006). Já tendo sido identificado em grandes quantidades durante surtos de EHDV em cervídeos dos EUA (Smith & Stallknecht, 1996).

Outras espécies encontradas em menor quantidade foram *C. foxi* Ortíz, 1950, *C. venezuelensis* Ortíz & Mirsa, 1950 e *C. debilipalpis* Lutz, 1913, espécies que até o momento não foram associadas a transmissão de nenhuma doença na América do Sul.

Todas as armadilhas capturaram pelo menos um *Culicoide*, porém as espécies coletadas em cada armadilha variaram. Como na A1, que possuiu a maior coleta foi identificado somente *C. insignis*, *C. paraensis*, *C. pusillus* e *C.* do grupo *Limai*. Além disto, nesta armadilha *C. insignis* foi encontrado mais que nas outras armadilhas, revelando que poderia haver algum atrativo para esta espécie neste local, aumentando o risco de transmissão de doenças para as espécies próximas, camelo e lhama. Ademais, a A4 teve a maior coleta de *C. paraensis* sendo possível que este inseto tenha uma certa preferência por cervídeos, como já relatado em estudos anteriores (Smith & Stallknecht, 1996).

Todas as espécies apresentaram uma maior coleta no período de verão. Durante o período de inverno houve uma redução da captura de todas as espécies, muitas chegando a não serem encontradas por vários meses como *C. pusillus* e *C. foxi*. *C. debilipalpis* aparenta ser uma exceção por ter sido mais coletado de outubro a novembro, apesar de ter sido identificado em fevereiro e dezembro também. Esta variação das espécies entre as estações do ano está relacionada com o maior risco de captura de *Culicoides* ser nos períodos de verão como observado anteriormente. Demonstrando um maior risco de transmissão de BTV e EHDV, especialmente devido a maior temperatura no verão, o qual leva a uma redução do PIE, agravando ainda mais a circulação destas orbivirose.

É perceptível uma diferença entre a captura de machos e fêmeas das diferentes espécies, sendo justificada pelas diferenças alimentares destes gêneros, já que somente a fêmea realiza repasto em animais, mas ambos podem se alimentar de fluidos de plantas (Mellor, Boorman & Baylis, 2000). Já a comparação entre os estágios gonadotróficos, mostra que as fêmeas paridas foram coletadas em quantidades maiores ou iguais aos os outros estágios. Estes resultados concordam com achados prévios em estudos realizados com *Culicoides* em zoológicos, que demonstraram que fêmeas foram mais identificadas que machos e as fêmeas paridas foram as mais encontradas (Labuschagne *et al.*, 2007; England *et al.*, 2020). Isto pode ser devido a uma maior quantidade de fêmeas identificadas como paridas que nulíparas, já que os *Culicoides* podem parir mais de uma vez, permitindo que existam mais indivíduos neste estágio. Além disso, quando estes insetos se encontram ingurgitados ou gravídicos é pouco provável que continuem próximos aos hospedeiros já que não necessitam mais se alimentar de vertebrados. Neste momento, provavelmente estariam em outros locais ricos em matéria orgânica para realizar a oviposição. Outro fator interessante é a proporção de fêmeas ingurgitadas coletadas que foi de 10%, valor superior ao encontrado em estudos prévios (Labuschagne *et al.*, 2007; England *et al.*, 2020).

Ao comparar a FPMZB-BH com outros zoológicos do mundo onde já foram realizados projetos de coleta de *Culicoides* foi possível perceber que todos possuíram uma grande diversidade de espécies coletadas, assim como no presente estudo. Porém, vários dos estudos anteriores relataram quantidades maiores de *Culicoides* coletados que o presente projeto, como no estudo realizado no Jardim Zoológico Nacional da África do Sul entre 2002 e 2004 que coletaram 478.040 exemplares e em outro estudo no zoológico de Chester em 2008 que foram coletados 35.401. Porém, outro estudo realizado no Zoológico de Greenville e no Zoológico de Riverbanks em 2007 coletaram 101 e 88 *Culicoides* respectivamente, números mais próximos dos obtidos

na atual pesquisa. Esta variação pode ser devido às condições ambientais diferentes entre cada zoológico e aos diferentes hábitos das espécies de *Culicoides* de cada região (Labuschagne *et al.*, 2007; Nelder *et al.*, 2010; Vilar *et al.*, 2011; Swanson *et al.*, 2018). A diferença na urbanização ao redor, presença de corpos d'água próximos, vegetação ao redor e dentro dos jardins zoológicos não se mostraram serem fatores relevante para o número de *Culicoides* coletados, já que houveram pesquisas em zoológicos com diferentes características dentro das citadas que conseguiram coletas superiores à do presente estudo (Labuschagne *et al.*, 2007; Nelder *et al.*, 2010; Vilar *et al.*, 2011; Swanson *et al.*, 2018; England *et al.*, 2020).

### 5.3.3. Teste de preferência alimentar

Para os testes de preferência alimentar foi utilizado amplificação do gene *citocromo b* (Cyt b), segundo Carvalho *et al.* (2021), do abdômen de fêmeas ingurgitadas, identificadas ao nível de espécie. Foram extraídas 56 amostras e após PCR para Cyt b, 14 (25%) apresentaram banda em gel de agarose 2%.

England *et al.* (2020) obtiveram 46% de sucesso na amplificação de amostras de *Culicoides* ingurgitados para análise de preferência alimentar, demonstrando que os resultados obtidos no presente estudo são condizentes com o de experimentos anteriores. Alguns fatores que podem ter dificultado a taxa de amplificação foram a degradação do DNA, pelas amostras de *Culicoides* terem sido armazenado durante muito tempo antes de serem processados, em alguns casos cerca de um ano já que todos os *Culicoides* ingurgitados foram processados ao mesmo tempo no final das coletas. O período entre a coleta dos maruins e o armazenamento dos mesmos em etanol 70%, também pode ter afetado. O fato de haver pequenas quantidade de sangue nas fêmeas ingurgitadas também pode dificultar este teste, especialmente no caso dos insetos que não estavam completamente ingurgitados ou possuíam o sangue parcialmente digerido (Hadj-Henni *et al.*, 2015; Riddin *et al.*, 2019; England *et al.*, 2020; Snyman *et al.*, 2021).

Foram coletados ao todo 568 *Culicoides*, destes 60 (10,5%) estavam ingurgitados. Das fêmeas ingurgitadas, foram extraídas 56 amostras de diferentes espécies: 42 de *C. insignis*, 5 de *C. pusillus*, 6 de *C. paraensis* e 3 de *C. debilipalpis*. Destas, 14 foram enviadas para sequenciamento, sendo ao todo 9 amostras de *C. insignis*, 3 de *C. debilipalpis* e 2 de *C. pusillus*. Após o sequenciamento duas amostras de *C. insignis* não conseguiram ser identificadas pelo *Blast*. O resultado do sequenciamento das amostras identificadas pode ser visualizado nos quadros a seguir (Quadro 21, 22 e 23).

Quadro 21: Resultado do sequenciamento das amostras extraídas do abdômen de *Culicoides* ingurgitados para análise da preferência alimentar.

Identificação das amostras	Espécie de <i>Culicoide</i>	Data coleta	Armadilha	Sequência usada	Porcentagem de similaridade (%)
Amostra 1	<i>Culicoides insignis</i>	20/12-21/12	A3	Consenso	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ) (93,9%), Cervo-dama ( <i>Dama dama</i> ) (90,9%)
Amostra 4	<i>Culicoides insignis</i>	19/01 - 20/01	A1	Consenso	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ) (93.54%)
Amostra 6	<i>Culicoides debilipalpis</i>	19/01 - 20/01	A4	Consenso	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ) (98,5%)
Amostra 7	<i>Culicoides debilipalpis</i>	19/01 - 20/01	A4	Consenso	Anta ( <i>Tapirus terrestris</i> ) (94.58%)
Amostra 22	<i>Culicoides insignis</i>	24/02-25/02	A2	Forward	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ) (87.6%); Cervo-dama ( <i>Dama dama</i> ) (86.5%)
				Reverse	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ) (77.5%)
Amostra 25	<i>Culicoides pusillus</i>	24/02-25/02	A3	Forward	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ) (92.8%)

Continuação Quadro 21.

Amostra 34	<i>Culicoides insignis</i>	24/02-25/02	A3	Reverse	Rola-birmana ( <i>Streptopelia tranquebarica</i> ) (95,1%), Lagarto do Irã ( <i>Agamura kermansis</i> ) (95,1%), Peixe amazônico ( <i>Teleocichla mindanensis</i> ) (95,1%), Trepadeira-americana ( <i>Certhia americana</i> ) (95,1%)
Amostra 39	<i>Culicoides insignis</i>	24/02-25/02	A3	Reverse	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ) (95,4%), Chital ( <i>Axis axis</i> ) (93,4%), Sambar ( <i>Cervus unicolor</i> ) (93%)
				Consenso	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ) (89,1%); Cervo-dama ( <i>Dama dama</i> ) (88,8%)
Amostra 45	<i>Culicoides insignis</i>	24/02-25/02	A3	Consenso	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ) (99,1%)
Amostra 52	<i>Culicoides insignis</i>	24/02-25/02	A5	Consenso	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ) (97,7%)
Amostra 54	<i>Culicoides pusillus</i>	10/03-11/03	A2	Consenso	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ) (95,8%)
Amostra 64	<i>Culicoides debilipalpis</i>	06/10-07/10	A6	Consenso	Elefante africano ( <i>Loxodonta Africana</i> ) (99,4%)

Quadro 22: Espécies identificadas pelo sequenciamento de preferência alimentar com mais de 90% de similaridade em relação a cada espécie de *Culicoide* ingurgitado analisada.

Espécie de <i>Culicoide</i>	Espécies Identificadas
<i>Culicoides insignis</i>	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ), Cervo-dama ( <i>Dama dama</i> ), Chital ( <i>Axis axis</i> ), Sambar ( <i>Cervus unicolor</i> ), Humano ( <i>Homo sapiens</i> ), Rola-birmana ( <i>Streptopelia tranquebarica</i> ), Lagarto do Irã ( <i>Agamura kermansis</i> ), Peixe amazônico ( <i>Teleocichla mindanensis</i> ), Trepadeira-americana ( <i>Certhia americana</i> )
<i>Culicoides debilipalpis</i>	Elefante africano ( <i>Loxodonta Africana</i> ), Humano ( <i>Homo sapiens</i> ), Anta ( <i>Tapirus terrestris</i> )
<i>Culicoides pusillus</i>	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )

Quadro 23: Espécies identificadas pelo sequenciamento de preferência alimentar com mais de 90% de similaridade em relação a cada espécie de *Culicoide* ingurgitado analisada, subdivididos pela armadilha em que foram capturados.

Armadilha	Espécie de <i>Culicoide</i>	Quantidade de <i>Culicoides</i> testados por armadilha	Espécies Identificadas
1	<i>Culicoides insignis</i>	1	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )
2	<i>Culicoides insignis</i>	1	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ); Cervo-dama ( <i>Dama dama</i> )
	<i>Culicoides pusillus</i>	1	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )

Continuação Quadro 23.

3	<i>Culicoides insignis</i>	4	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> ), Cervo-dama ( <i>Dama dama</i> ), Chital ( <i>Axis axis</i> ), Sambar ( <i>Cervus unicolor</i> ), Humano ( <i>Homo sapiens</i> ), Rola-birmana ( <i>Streptopelia tranquebarica</i> ), Lagarto do Irã ( <i>Agamura kermansis</i> ), Peixe amazônico ( <i>Teleocichla mindanensis</i> ), Trepadeira-americana ( <i>Certhia americana</i> )
	<i>Culicoides pusillus</i>	1	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )
4	<i>Culicoides debilipalpis</i>	2	Humano ( <i>Homo sapiens</i> ), Anta ( <i>Tapirus terrestris</i> )
5	<i>Culicoides insignis</i>	1	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )
6	<i>Culicoides debilipalpis</i>	1	Elefante africano ( <i>Loxodonta Africana</i> )

Resultados de sequenciamento genético com valores de similaridade inferiores a 95% são considerados baixos e as amostras são consideradas não sendo plenamente identificadas. Porém como o fragmento possui 358 bp, sendo cada amostra extraída do abdome de um Culicoide, insetos hematófagos de tamanho reduzido, assim gerando uma dificuldade para a extração e resultando em pouco material genético, foi aceito resultados com valores inferiores aos de 95%. Além disto, muitas das sequencias da região conservada do Cyt b presente no DNA mitocondrial dos vertebrados de interesse podem não estar completamente disponíveis nos bancos de dados, assim sendo outro fator que complica a análise dos sequenciamentos. Outro fator importante é que existe a possibilidade do maruim ter se alimentado de mais de um vertebrado, desta forma interferindo nas análises, para evitar tais interferências seria necessário o uso de outro primer para identificação de espécies como o citocromo C oxidase subunidade 1 (Cox 1), outro marcador mitocondrial.

Estes resultados comprovam pela primeira vez, na América do Sul, que possíveis vetores de BTV e EHDV se alimentaram em cervo-nobre (*Cervus elaphus*) e cervo-dama (*Dama dama*), conhecidos hospedeiros.

No Jardim Zoológico de Belo Horizonte não existem exemplares de chital (*Axis axis*) nem de sambar (*Cervus unicolor*). Desta forma, para a amostra 39, acreditamos que a sequência amplificada seja de cervo-nobre. Foi identificado uma grande similaridade entre as amostras de cervídeos, de forma a levantar uma dúvida se o mesmo inseto se alimentou de ambos os animais, cervo-nobre e cervo-dama, já que estes recintos são próximos ou somente suas sequências são similares o suficiente para ambos serem identificados quando foi realizado o *Blast*. Este procedimento compara a sequência genética da amostra com todas do banco de dados, apresentando todas as sequências atribuindo um valor de cobertura e de similaridade, e caso sequências armazenadas no banco de dados sejam similares, ambas podem ser identificadas.

Devido à grande quantidade de sequências de *C. insignis* identificadas como pertencentes a cervo-nobre e cervo-dama, 3/9 (33%), é possível que esta espécie possa ter preferência por se alimentar em cervídeos. As duas amostras de *C. pusillus* estudadas mostram que esta espécie se alimentou em seres humanos (*Homo sapiens*).

Outro fator interessante é que todas as espécies de *Culicoides* se alimentaram de seres humanos (*Homo sapiens*), sendo um total de 6 das 14 amostras, 43%. A picada do *C. insignis* é relacionada à dermatite alérgica em diferentes espécies, incluindo seres humanos (Corrêa *et al.*, 2007). Desta forma a alimentação identificada mostra que é necessária uma atenção para este inseto com relação ao desconforto e possíveis complicações que esta dermatite pode causar em visitantes e trabalhadores do zoológico. Estes dados de *Culicoides* se alimentando de seres humanos são similares aos já registrados em outros estudos com outras espécies destes insetos que também obtiveram uma alta porcentagem de DNA humano identificado. A alimentação de maruims em seres humanos significa uma maior possibilidade de transmissão de arboviroses (Snyman *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que esta é a primeira identificação de *C. debilipalpis* Lutz, 1913 no estado de Minas Gerais (MG) (Santarém & Felipe-Bauer, 2021). Esta espécie já foi identificada no Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina (Santarém & Felipe-Bauer, 2021). Porém, nenhum estudo havia relatado a circulação desta espécie em MG, ainda que ela seja encontrada em vários outros estados do Sul e Sudeste. Esta espécie já foi descrita como um possível vetor de BTV e EHDV na América do Norte (Mullen *et al.*, 1985a e b; Smith & Stallknecht, 1996; Becker *et al.* 2010; Savini *et al.*, 2011; McGregor *et al.* 2018; Becker *et al.* 2020; McGregor, Shults & McDermott, 2022). É conhecida por se alimentar de espécies hospedeiras de *Orbivirus* e, caso se alimentem de sangue infectado, já foi comprovada a replicação viral de BTV e EHDV (Mullen *et al.* 1985b; Smith, Stallknecht & Nettles, 1996), além de já terem sido identificados insetos desta espécie, capturados em fazendas dos EUA, infectados por BTV (Becker *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2020). Pelas revisões bibliográficas realizadas acreditamos que é a primeira vez que é identificado o *C. debilipalpis* se alimentando de elefante africano (*Loxodonta Africana*) e anta (*Tapirus terrestris*), possíveis hospedeiros de *Orbivirus*. Não se conhece o papel da anta em nem do *C. debilipalpis*, no ciclo de transmissão desses *Orbivirus* no Brasil. Diferente de estudos anteriores que descreveram esta espécie possuindo preferência por cervídeos, não foi identificado nenhum indivíduo que se alimentou de espécies deste grupo (Smith & Stallknecht, 1996; Becker *et al.* 2010; McGregor *et al.* 2018). Devido a todos estes fatores descritos, são necessários mais estudos para confirmar a sua importância no ciclo de transmissão de BTV e EHDV.

Foi identificado que o *C. insignis* pode ter se alimentado de uma rola-birmana (*Streptopelia tranquebarica*), uma trepadeira-americana (*Certhia americana*), um lagarto do Irã (*Agamura kermansis*) ou um peixe amazônico (*Teleocichla mindanensis*). Já que as quatro espécies apresentaram 95,1% de identidade com a sequência do *C. insignis* testada e não são encontradas na região do zoológico é possível que o Cyt b destas espécies possuam alta similaridade genética com outra espécie presente no zoológico, cuja sequência do Cyt b não está presente nos bancos de dados.

Estudos anteriores mostraram que diferentes espécies de *Culicoides* têm preferência por diferentes animais, existindo os que se alimentam somente de mamíferos ou aves e outros que tem uma alimentação generalista como identificados no *C. insignis*. Esta alimentação generalista do *C. insignis* também foi identificada em estudos anteriores, em que esta espécie foi identificada se alimentando de aves, roedores e cães (Gusmão *et al.*, 2015). Alguns insetos tendem a se alimentar das espécies mais próximas, não importando quais sejam, e são considerados de alimentação oportunista, outro motivo relacionado a este fato seria o comportamento migratório dos vertebrados que obrigaria estes insetos a adaptarem sua alimentação às espécies presentes no local (England *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2021; Snyman *et al.*, 2021). Além disto, devido ao tamanho reduzido dos *Culicoides*, estes insetos podem ser transportados por vários quilômetros pelo vento (Ducheyne *et al.*, 2007), forçando eles a se alimentarem das espécies que estiverem presentes. Assim, esses podem ser alguns dos motivos da grande variedade de hospedeiros dos *Culicoides*. Foi descrito que espécies generalistas podem apresentar uma redução na sua capacidade como vetor, devido à grande variedade de hospedeiros em que se alimentam. Apesar disto, este hábito pode permitir a transmissão de patógenos entre uma variedade maior de hospedeiros (Santiago-Alarcon *et al.*, 2013; Snyman *et al.*, 2021). Além disso, espécies generalistas costumam ter uma maior abundância, por conseguirem sobreviver em mais ambientes diferentes, permitindo assim uma maior transmissão e auxiliando na manutenção de ciclos de diferentes doenças (Brown, 1984; Carvalho *et al.*, 2021).

A inferência de preferência alimentar por análises do sangue ingerido pelos *Culicoides* é complexa, ainda mais com uma quantidade limitada de exemplares de cada uma das espécies estudadas, mas é um bom indicativo de quais espécies devem ser tratadas com maior atenção especialmente no caso dos possíveis vetores de BTV e EHDV, *C. insignis*, *C. pusillus* e *C. debilipalpis*. O entendimento dos diferentes hospedeiros de cada espécie de *Culicoides* permite que sejam desenvolvidos melhores modelos preditivos em relação a transmissão de patógenos e metodologias para a prevenção de diferentes doenças (Hopken *et al.*, 2017).

#### 5.4. Sorotipagem de EHDV por sequenciamento

Para a realização da sorotipagem de EHDV foram utilizadas amostras de fígado e rim de uma fêmea de veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) originária da FPMZB-BH, encontrada morta no recinto no dia 2 de abril de 2020 com sinais de doença hemorrágica. Estas amostras foram identificadas como positivas para EHDV por qRT-PCR. Estas amostras foram isoladas em células KC e BHK-21 e o ds-RNA foi extraído da amostra de rim, segundo protocolo padronizado no LPVA. A amostra extraída foi identificada como Zoo e após a extração, apresentou padrão migração de bandas características para EHDV (Figura 10). Este padrão permite verificar o sucesso da extração, bem como avaliar se não houve contaminação por outro *Orbivirus*.

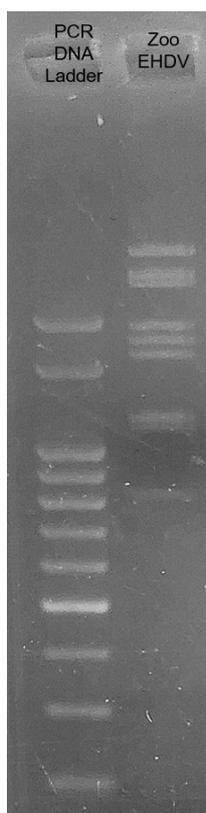


Figura 10: Padrão de migração das bandas da amostra extraída em gel de agarose 2%.

Em seguida foi realizado RT-PCR para amplificação do Seg-2, sendo identificado que a amostra tinha banda compatível com o grupo A de EHDV, em qual segundo Sailleau *et al.* (2012), estão o EHDV-2 e o EHDV-7. Então, foi realizado o sequenciamento do Seg-2 da amostra e os resultados foram processados para que fosse realizado um *Blast*.

Não foi possível montar uma sequência consenso com boa qualidade da amostra, porém ao realizar um *Blast* com as sequências *Forward* e *Reverse* individualmente, ambas identificaram esta amostra como sendo um EHDV sorotipo 2 (EHDV-2). A sequência *Forward* do Zoo se alinhou com um EHDV-2 isolado de um veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) em Nova Jersey, EUA em 1975 (Wilson *et al.*, 2016) com 100% de cobertura e 90.10% de identidade e a sequência *Reverse* se alinhou com um EHDV-2 isolado de um *Culicoide* em Kentucky, EUA em 1971 (Cheney *et al.*, 1996) com 99% de cobertura e 88.55% de identidade, sendo ambas sequências de referência muito similares geneticamente e que se alinham no mesmo grupo quando montado árvores filogenéticas para o segmento VP2 (Cheney *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2016). Assim, ambas as sequências da amostra Zoo foram similares a amostras de EHDV-2 norte-

americanas. As informações dos sequenciamentos estão resumidas no Quadro 24. As sequências e imagens do *Blast* de cada uma estão presentes no Anexo 5.

Quadro 24: Informações das porcentagens de similaridade dos sequenciamentos do segmento VP2 da amostra de EHDV isolada.

Identificação das amostras	Sequencia usada	Porcentagem de similaridade (%)
Zoo	Forward	EHDV-2 (90.10%)
	Reverse	EHDV-2 (88.55%)

O veado-catingueiro que foi encontrada morta no recinto no dia 2 de abril de 2020 na FPMZB-BH, após necropsia e análise histopatológica apresentou lesões hemorrágicas sistêmica associada a lesões vasculares, hipertrofia endotelial e vasculite, compatíveis com infecção por *Orbivirus*. Algumas dos achados mais relevantes foram edema pulmonar e no sistema respiratório superior, pneumonia intersticial linfo-histiocitária multifocal, mucosa oral e vaginal cianótica, úlceras na língua, áreas de hemorragia multifocal em diferentes órgãos, com trombos, congestão e infiltrado inflamatório, linfadenite neutrofílica multifocal discreta com histiocitose e hemorragia moderada, esplenite fibrino-hemorrágica difusa moderada e glossite necro-hemorrágica ulcerativa histiocítica e neutrofílica com trombose. Além disto, a fêmea possuía um feto no terço médio da gestação que também apresentou hemorragia multifocal em vários órgãos e apresentou petéquias na pele, especialmente na cabeça. Foram encontrados danos endoteliais generalizados, edema, congesto, trombos, hipóxia tecidual, hiperemia, hemorragia, necrose, fibrose, dentre outras lesões microscópicas características de doenças hemorrágicas. Devido a estes achados de necropsia e histopatologia condizentes com infecção por *Orbivirus* foi realizado qRT-PCR para diagnóstico de BTV e EHDV, foram utilizadas amostras de fígado, rim e placenta. As amostras de fígado e rim foram positivas para EHDV e a de placenta foi negativa, a pesar das lesões encontradas no feto. Desta forma, as amostras positivas foram utilizadas para o isolamento e a amostra de rim foi selecionada para ser sequenciada identificando infecção por EHDV-2.

O EHDV-2 já foi identificado em estudos prévios no Brasil em cervídeos originários do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), no Paraná, e de um animal no Zoológico de Pomerode, Santa Catarina, em um veado-bororó (*Mazama nana*), demonstrando que este sorotipo está circulando em diferentes estados brasileiros levando a morte diferentes espécies de cervídeos, sendo uma grande preocupação para a conservação destas espécies (Favero *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2018).

No caso do EHDV-2 identificado no Zoológico de Pomerode em um veado-bororó, os sinais clínicos associados foram cianose e petéquias na língua e mucosa gastrointestinal, conteúdo hemorrágico no intestino, petéquias na bexiga urinária, petéquias e equimose no pericárdio e epicárdio. Além disso, foi visualizado o baço contraído, linfonodos e rins hemorrágicos, pulmão com congestão e petéquias e conteúdo fluido no sistema respiratório. Na histopatologia foram identificados achados de congestão difusa no rim e hemorragia subendocárdica extensa (Favero *et al.*, 2013). Estes achados são similares aos identificados no veado-catingueiro testado nesse estudo, que apresentou mais sinais de doença hemorrágica, sendo identificado edema pulmonar, congestão e trombos (Anexo 4).

No CASIB existem relatos de várias mortes de cervídeos, veados-bororós e cervos-do-pantanal por diferentes sorotipos de BTV e EHDV. Os animais apresentam sinais compatíveis com doenças hemorrágicas como edemas, laminite, trombos, congestões, úlceras e hemorragias generalizadas. Os quadros costumam ser agudos podendo haver mortes súbitas. Neste local já foram identificados BTV-3, 4, 14, 18, 19 e 22 e EHDV-1 e 2. Foi relatado que os cervídeos normalmente vêm a óbito durante surtos de *Orbivirus*, que costumam ocorrer de março a junho, logo após o fim verão, similar ao encontrado no presente estudo em que o animal veio a óbito logo após o fim do verão (Baldini, 2016; Baldini *et al.*, 2018; Pinheiro, 2019).

Em São Paulo, foram identificados animais do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal e do Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal (CCCP), Companhia Energética de São Paulo, Promissão, que vieram a óbito com sinais sugestivos de doença viral hemorrágica. Após qRT-PCR foram diagnosticados cervos-do-pantanal, veados-catingueiros e veados-mateiros com infecção de BTV. Além disto foram identificados vários animais soropositivos para BTV no NUPECCE. Também foi descrito cervídeos positivos para BTV por qRT-PCR, em amostras de sangue total, sem sinais clínicos. Caso similar ao encontrado no presente estudo em que cervídeos foram soropositivos para BTV e EHDV, demonstrando que foram infectados por estes vírus, mas não há registros de sinais clínicos nestes animais. Mostrando que, possivelmente estes animais, apesar de ter ocorrido viremia, não desenvolveram sinais ou possuíram somente sinais leves. Também foi relatado que, entre os animais que vieram a óbito por BTV, uma grande parte morreu no período do verão (Kawanami, 2012; Kawanami *et al.*, 2012; Kawanami, 2017; Kawanami *et al.*, 2018).

Os registros dos cervídeos que vieram a óbito por *Orbivirus* no Brasil relatam uma variedade de sinais, podendo ser devido à variedade de espécies e de sorotipos em cada local, estado imune de cada animal, época do ano e quantidade de vírus inoculada pelos vetores. Porém, todos apresentaram sinais compatíveis com doenças hemorrágicas. Desta forma, para tentar controlar surtos é necessário a realização de diagnósticos o quanto antes. Outro fator similar nos registros, é que a maioria dos animais morreram durante ou próximo ao verão, período com clima quente e chuvoso que favorece a propagação dos vetores, aumentando a chance de infecções e ocorrência de surtos (Mellor *et al.*, 2000). Desta forma, em locais que possuem cervídeos, como zoológicos e centros de conservação, é necessário estabelecer medidas que visem prevenir a transmissão destas doenças como alojar os animais em estábulos telados do pôr do sol até o nascer do sol, usar inseticidas e repelentes de insetos e controlar o acúmulo de matéria orgânica e fezes (Tweedle and Mellor, 2002; Lobato *et al.*, 2015; MacLachlan *et al.*, 2015; 2020; WOA, 2019a, b). BTV e EHDV são graves problemas para a conservação de cervídeos e devem ser controladas para prevenir surtos.

## 6. CONCLUSÃO

- BTV e EHDV circulam na FPMZB-BH infectando diferentes espécies de mamíferos.
- Foram identificadas espécies hospedeiras de *Orbivirus* soropositivos para BTV e EHDV na FPMZB-BH em amostras de soros coletadas de 2021 a 2022 e em amostras presentes no banco de soro de 2012 a 2021.
- Nenhum dos cervídeos que vieram a óbito durante o experimento, 2021 a 2022, foram diagnosticados como positivos para BTV e EHDV por qRT-PCR.
- Foi identificado uma maior quantidade de *Culicoides* durante o período do verão.
- Foi identificado um maior número de *Culicoides* próximo aos recintos dos Camelos e lhamas.
- Foram identificados vetores competentes de BTV e EHDV descritos na América do Sul, *Culicoides insignis* e *Culicoides pusillus*, na FPMZB-BH.
- *Culicoides debilipalpis* está presente no estado de Minas Gerais.
- *Culicoides insignis* se alimenta de hospedeiros susceptíveis à BTV e EHDV.
- *Culicoides debilipalpis* se alimenta de hospedeiros susceptíveis à BTV e EHDV.
- Foram identificadas diferentes espécies de *Culicoides* se alimentando de seres humanos.
- Foi realizada a sorotipificação de EHDV-2 de um veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) que veio a óbito na FPMZB-BH em abril de 2020.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, K.A.; MACLACHLAN, N. J.; KAT, P. W.; HOUSE, C.; O'BRIEN, S. J.; LERCHE, N. W.; SAWYER, M.; FRANK, L. G.; HOLEKAMP, K.; SMALE, L.; MACNUTT, J. W.; LAURENSEN, M. K.; MILLS, M. G. L.; OSBURN, A. B. I. Evidence of natural bluetongue virus infection among african carnivores. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51(5), p. 568-576, 1994.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E. *et al.* Reoviridae. In: FLORES, E. F. (Eds.) *Virologia Veterinária*. 3. ed. Santa Maria: Ufsm., p. 773-808, 2017.
- ALVES, F. A. L.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, W. W.; SILVA, M. L. C. R.; LOBATO, Z. I. P.; CLEMENTINO, I. J. Seroprevalence and risk factors for Bluetongue in rams of the Sertão and Borborema mesoregions, semi-arid of Paraíba state, Northeastern Brazil. *Ciência Rural* 39, p.484-489, 2009.
- ANTHONY, S. J.; DARPEL, K. E.; BELAGANAHALLI, M. N.; MAAN, N.; NOMIKOU, K.; SUTTON, G.; ATTOUI, H.; MAAN, S.; MERTENS, P. P. C. *RNA segment 9 exists as a duplex concatemer in an Australian strain of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): Genetic analysis and evidence for the presence of concatemers as a normal feature of orbivirus replication.* 420(2), 164–171. doi:10.1016/j.virol.2011.09.009, 2011.
- ANTHONY, S.J.; MAAN, S.; MAAN, N.; KGOSANA, L.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BATTEN, C., DARPEL, K. E.; SUTTON, G.; ATTOUI, H.; MERTENS, P. P. C. 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.*, 145, p. 200–210, 2009. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19632281/> >
- ATTOUI, H.; MAAN, S.; ANTHONY, S.J.; MERTENS, P.P.C. Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: Their relationships and taxonomy. *Bluetongue*, 23–52, doi:10.1016/b978-0-12369368-6.50007-1, 2009.
- ATTOUI, H.; NOMIKOU, K.; MAAN, S.; BELAGANAHALLI, M.; MERTENS, P.P.C. Orbiviruses. Reference Module in Biomedical Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.02628-3, 2016.
- AZEVEDO, N. A.; OLIVEIRA, M. L.; DUARTE, J. M. B.. Guia ilustrado dos cervídeos brasileiros. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Mastozoologia, 2021. 41 p. <https://doi.org/10.32673/9788563705037>. 2021.
- BALDET, T.; DELECOLLE, J. C.; CETRE-SOSSAH, C.; MATHIEU, B.; MEISWINKEL, R.; GERBIER, G.; Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 84–97, 2008.
- BALDINI, M. H. M. Pesquisa de doenças hemorrágicas em cervídeos do Refúgio biológico Bela Vista da Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu-PR / Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.
- BALDINI, M. H. M.; DE MORAES, A. N. Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife with emphasis on the South American scenario. *Veterinaria Italiana* 57 (2), 97-103. doi: 10.12834/VetIt.1679.8914.5, 2021.
- BALDINI, M.H.M., ROSA, J.C.C., MATOS, A.C.D., CUBAS, Z. S., GUEDES, M.I.M.C., DE MORAES, W., OLIVEIRA, M.J., FELIPPI, D.A., LOBATO, Z.I.P. & DE MORAES, A.N. Multiple bluetongue virus serotypes causing death in Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) in Brazil, 2015–2016. *Veterinary Microbiology*. 2018. Available in < <https://el.booksc.me/book/73049338/81d1f2> >
- BARRATT-BOYES, S. M.; MACLACHLAN, N. J. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Veterinary Microbiology*, 40, 361e371, 1994.
- BARRETTO, M. P. Sobre o género *Culicoides* Latreille, 1809, com a descricao de três novas espécies (Diptera, Ceratopogonidae). *Anais da Faculdade de Medicina (da Universidade) de Sao Paulo* 20:89-105, pls. 1-4, 1944.
- 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.
- BATTEN, C. A.; HARIF, B.; HENSTOCK, M. R.; GHIZLANE, S.; EDWARDS, L.; LOUTFI, C.; OURA, C. A. L.; EL HARRAK, M. Experimental infection of camels with bluetongue virus. *Res Vet Sci*, 90, 533-535, 2011.
- BECKER, M.E.; ROBERTS, J.; SCHROEDER, M. E.; GENTRY, G.; FOIL, L. D. Prospective study of epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus transmission in captive ruminants. *J Med Entomol.* 2020;57:1277–85. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa027>, 2020.
- BECKER, M. E.; REEVES, W. K.; DEJEAN, S. K.; EMERY, M. P.; OSTLUND, E. N.; FOIL, L. D. Detection of bluetongue virus RNA in field-collected *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) following the discovery of bluetongue virus serotype 1 in white-tailed deer and cattle in Louisiana. *J. Med. Entomol.* 47: 269–273, 2010.

BELBIS, G., ZIENTARA, S., BRÉARD, E., SAILLEAU, C., CAIGNARD, G., VITOUR, D., & ATTOUI, H. Bluetongue Virus: From BTV-1 to BTV-27. *Advances in Virus Research*, p. 161–197, doi: 10.1016/bs.aivir.2017.08.003, 2017.

BENNETT, G. F. On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. *Canadian Journal of Zoology* 39: 17-33, 1961.

BESSELL, P. R.; AUTY, H. K.; SEARLE, K. R.; HANDEL, I. G.; PURSE, B. V.; BRONSVOORT, B. M. D. C. Impact of temperature, feeding preference and vaccination on Schmallenberg virus transmission in Scotland. *Sci. Rep.* 4 <https://doi.org/10.1038/srep05746>, 2014.

BIANCHI, R. M.; PANZIERA, W.; FACCIN, T. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de surtos de língua azul em ovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 37, n. 37, p. 1443-1452, 2017.

BLACKWELL, A.; BROWN, M.; MORDUE, W. The use of an enhanced ELISA method for the identification of *Culicoides* blood meals in host-preference studies. *Med Vet Entomol* 9(2):214–8. doi:10.1111/j.1365-2915.1995.tb00183.x, 1995.

BLACKWELL, A.; MORDUE, A. J.; MORDUE, W. Identification of blood meals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med Vet Entomol* 8(1):20–4. doi:10.1111/j.1365-2915.1994.tb00378.x, 1994.

BLANTON, F. S.; WIRTH, W. W. The sandflies (*Culicoides*) of Florida (Diptera: Ceratopogonidae). *Arthropods Fla. Neighb. Land Areas* 10:1–204. 1979.

BOAKYE, D. A.; TANG, J.; TRUC, P.; MERRIWEATHER, A.; UNNASCH, T. R. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med. Vet. Entomol.* 13, 282–287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00193.x>, 1999.

BORKENT, A. The Biting Midges, the Ceratopogonidae (Diptera) *in*: Marquardt, W.H. (eds). *Biology of disease vectors*. Segunda edição. Elsevier Academic Press p. 113-126, 2005.

BORKENT, A. *The Subgeneric Classification of Species of Culicoides - thoughts and a warning*. Retrieved from <http://www.inhs.illinois.edu/files/5014/6532/8290/CulicoidesSubgenera.pdf>, 2016.

BORKENT, A.; DOMINIAC, P. Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, v. 1, p. 1-377, 2020.

BORKENT, A.; SPINELLI, G. R. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera : Insecta) *in*: Adis, J.; Arias, J.R., Rueda-Delgado, G., Wantzen, K.M. (Eds.) *Aquatic Biodiversity in Latin América (ABLA)*. Vol. 4 . Pensoft, Sofia-Moscow, 198 pp, 2007.

BOUWKNEGT, C.; VAN RIJN, P. A.; SCHIPPER, J. M.; HOLZEL, D.; BOONSTRA, J.; NIJHOF, A. M.; VAN ROOIJ, M. A.; JONGEJAN, F. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology*, 52, 183–92, 2010.

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.

BROWN, E. S.; GORMAN, B. M.; TESH, R. B.; KNUDSON, D. L. Isolation of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses from mosquitoes collected in Indonesia. *Veterinary Microbiology* 32, 241–251, 1992.

BROWN, J.H. On the relationship between abundance and distribution of species. *Am. Nat.* 124, 255–279. <https://doi.org/10.1086/284267>, 1984.

BUMBAROV, V.; GOLENDER, N.; JENCKEL, M; WERNIKE, K.; BEER, M.; KHINICH, E.; ZALESKY, O.; ERSTER, O. Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transbound Emerging Diseases* 67(1), p.171–182. 2020(Jan). Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31469936/> >

CABALLERO-GÓMEZ, J.; TERRIZA, D. C.; PUJOLS, J.; MARTÍNEZ-NEVADO, E.; CARBONELL, M. D.; GUERRA, R.; RECUERO, J.; SORIANO, P.; BARBERO, J.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. *Monitoring of bluetongue virus in zoo animals in Spain, 2007–2019* . *Transboundary and Emerging Diseases*, (), – . doi:10.1111/tbed.14147, 2021.

CAMPEN, H. V.; DAVIS, C.; FLINCHUM, J. D.; BISHOP, J. V.; SCHIEBEL, A.; DUNCAN, C.; SPRAKER, T. Epizootic hemorrhagic disease in yaks (*Bos grunniens*). *J Vet Diagn Invest*, 25 (3), 443-446, 2013.

CAMPOS, M. T. G. Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a Língua Azul e a Doença Epizootica hemorrágica para cervídeos: ensaios pré-clínicos. / Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais Área de concentração: Ciência Animal. 71 f:il, 2020.

CARVALHO, L. P. C.; JÚNIOR, A. M. P.; DE PAULO, P. F. M.; SILVA, G. S.; COSTA, G. S.; FREITAS, M. T. S.; PESSOA, F. A. C.; MEDEIROS, J. F. DNA-based blood meal analysis of *Culicoides* (Diptera:

Ceratopogonidae) species from Jamari National Forest, Southwestern Amazon, Brazil. *Acta Tropica* 221 (2021) 106025. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106025>, 2021.

CARVALHO, L. P. C.; SILVA, F. S. Seasonal abundance of livestock-associated *Culicoides* species in northeastern Brazil. *Med Vet Entomol*, 28, 228-231, 2014.

CASTELLÓN, E. G.; VERAS, R. S. *Maruins (Culicoides: Ceratopogonidae) na Amazônia brasileira*. Manaus : Editora INPA, 2015.

CÊTRE-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.

CHENEY, I. W.; YAMAKAWA, M.; ROY, P.; MECHAM, J. O.; WILSON, W. C. Molecular characterization of the segment 2 gene of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 2: gene sequence and genetic diversity. *Virology*. 1996 Oct 15;224(2):555-60. doi: 10.1006/viro.1996.0563. PMID: 8874517, 1996.

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.

CONRATHS, F. J.; GETHMANN, J. M.; STAUBACH, C.; METTENLEITER, T. C.; BEER, M.; *et al.* Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 433e435, 2009.

COQUILLET, D. W. A new Ceratopogon from Brazil. *Journal of the New York Entomological Society* 12:35-36, 1904.

CORRÊA, T. G.; FERREIRA, J. M.; RIET-CORREA, G.; RUAS, J. L.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F.; GUIMARAES, A.; FELIPPE-BAUER, M. L. Seasonal allergic dermatitis in sheep in southern Brazil caused by *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Veterinary Parasitology* 145 181–185, 2007.

COSTA LIMA, A. DA. Chave das especies de *Culicoides* da regioa neotropica (Diptera: Ceratopogonidae). *Ibid.* 32:411-422, 1937.

DA SILVA, T. G.; LIMA, M. S.; SPEDICATO, M.; CARMINE, I.; TEODORI, L.; LEONE, A.; MARTINS, M. S. N.; BUCHALA, F. G.; HELLWIG, K. S.; ROMALDINI, A. H. C. N. E. S., SAVINI, G.; PITUCO, E. M. Prevalence and risk factors for bluetongue in the State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Medicine and Science*, v.4, p.280-287, 2018. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29963762/> >

DAMASCENO, C. P. Estudos sobre a transmissão de *Mansonella* sp. (Nematoda: Onchocercidae) por *Culicoides* sp. (Diptera: Ceratopogonidae) na comunidade de Assunção, Rio Içana, Amazonas / Camila Pinto Damasceno.--- Manaus : [s.n.], 2009.

DARPEL, K. E.; MONAGHAN, P.; ANTHONY, S. J.; TAKAMATSU, H.; MERTENS, P. P. Bluetongue virus in the mammalian host and the induced immune response. In: Bluetongue, P Mellor, M Baylis and P Mertens, Eds, Elsevier, London, pp. 265e284, 2009.

DEEM, S. L.; NOSS, A. J.; VILLARROEL, R.; UHART, M. M.; KARESH, W. B. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Subulo gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. *J Wildl Dis*, 40 (1), 92-98, 2004.

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.*;178:445-53. PMID: 2989884, 1985.

DERCKSEN, D.; GROOT NIBBELINK, N.; PAAUWE, R.; BACKX, A.; VAN RIJN, P.; VELLEMA, P. First outbreak of bluetongue in goats in The Netherlands (in Dutch). *Tijdschrift Diergeneeskunde* 132, 786–790, 2007.

DOMMARGUES, L.; VIAROUGE, C.; METRAS, R.; YOUSOUFFI, C.; SAILLEAU, C.; ZIENTARA, S.; CARDINALE, E.; CÊTRE SOSSAH, C. Evidence of bluetongue and Epizootic Haemorrhagic disease circulation on the island of Mayotte. *Acta Trop*, 191, p.24-28, 2019. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30590029/> >

DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; PIOVEZAN, U.; BECCACECI, M. D.; GARCIA, J. E. *Blastocercus dichotomus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T2828A22160916. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T2828A22160916.en.>, 2016. Accessed on 13 December 2022.

DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; OLIVEIRA, M. L. *Mazama nana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T29621A22154379. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T29621A22154379.en.>, 2015. Accessed on 13 December 2022.

DUARTE, J.M.B; ARITA, G.M.M. Ocorrência de doença hemorrágica em um plantel de *Mazama gouazoubira* (veado catiguero), possivelmente causado pelo vírus da língua azul e orbivírus relacionados.

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

DUCHEYNE, E.; DE DENKEN, R.; BECU, S.; CODINA, B.; NOMIKOU, K.; MANGANA, O.; GEORGIEV, G.; PURSE, B. V.; HENDRICKX, G. Quantifying the wind dispersal of *Culicoides* species in Greece and Bulgaria. *Geospatial Health* 2, 177–189, 2007.

DUNBAR, M. R.; CUNNINGHAM, W. M.; ROOF, J. C. Seroprevalence of selected disease agents from free-ranging black bears in Florida. *J Wildl Dis*, 34, p. 612-619, 1998. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9706572/> >

EFSA, European Food Safety Authority (2017). <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2017.4957> (Accessed 20th November 2020).

ELBERS, A.R.W., BACKX, A., MINTIENS, K., GERBIER, G., STAUBACH, C., HENDRICKX, G., VAN DER SPEK, A. Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 87, 31–40, 2008. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18620768/> >

ELLIS, J. A.; COEN, M. L.; MACLACHLAN, N. J.; WILSON, W. C.; WILLIAMS, E. S.; *et al.* Prevalence of bluetongue virus expression in leukocytes from experimentally infected ruminants. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 1452e1456, 1993.

ENGLAND, M. E.; PEARCE-KELLY, P.; BRUGMAN, V. A.; KING, S.; GUBBINS, S.; SACH, F.; SANDERS, C. J.; MASTERS, N. J.; DENISON, E.; CARPENTER, S. *Culicoides* species composition and molecular identification of host blood meals at two zoos in the UK. *England et al. Parasites Vectors*. 13(1), p. 139, 2020(Mar). Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178710/> >

ERRAM, D., BURKETT-CADENA, N. Oviposition of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) under laboratory conditions with notes on the developmental life history traits of its immature stages. *Parasites Vectors* 14, 522 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05025-5>

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.

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

FALLIS, A. M.; BENNETT, G. F. Ceratopogonidae as intermediate hosts for *Haemoproteus* and other parasites. *Mosquito News* 21: 21-28, 1961.

FARIAS, E. S. Efeito antrópico na diversidade de maruins (Diptera: Ceratopogonidae) em uma área de assentamento rural na Amazônia / Emanuelle de Sousa Farias. - Manaus, 2014.

FARIAS, E. S.; ALMEIDA, J. F.; PEREIRA-SILVA, J. W.; COELHO, L. S.; LUZ, S. L. B.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M.; PESSOA, F. A. C. Diversity of biting midges *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of disease, in different environments in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* | on line | Vol.:53:e20200067, 2020. doi: 10.1590/0037-8682-0067-2020, 2020.

FARIAS, E. S.; ALMEIDA, J. F.; PESSOA, F. A. C. List of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. *Check List* 12(6), 1-27, 2016(Nov). Available in < <https://checklist.pensoft.net/article/19604/> >

FAVERO, C. M.; MATOS, A. C. D.; CAMPOS, F. S.; CÂNDIDO, M. V.; COSTA, E. A.; HEINEMANN, M. B.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; LOBATO, Z. I. P. Epizootic Hemorrhagic Disease in Brocket Deer, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 19, No. 2, p.346-348, 2013(Fev). Available in < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559040/> >

FELIPPE-BAUER, M. L. A new Neotropical *Culicoides* from Minas Gerais (Diptera: Ceratopogonidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82:147-148, 1987.

FELIPPE-BAUER, M. L.; GONZAGA, G. P.; CAVALCANTE, R. C.; GOMES, R. G. A.; SILVA, R. A. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Ceará State, northeastern Brazil: Diversity, new records and bionomic approaches. *Cuadernos de Investigación UNED* (ISSN digital: 1659-441X) Vol. 11(2): 137-144, Junio, 2019

FELIPPE-BAUER, M. L.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. A new Neotropical biting midge of the *Culicoides debilipalpis* group (Diptera: Ceratopogonidae). *Ibid.* 82:149-150, 1987.

FELIPPE-BAUER, M. L.; STERNHEIM, U. S. *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) infestations in cities of the Itapocú River Valley, Southern Brazil. *Entomol. News*, 119(2):185-192, 2008.

FERNANDES-SANTOS, R. C.; MEDICI, E. P.; TESTA-JOSÉ, C.; MICHELETTI, T.; HEALTH ASSESSMENT OF WILD LOWLAND TAPIRS (TAPIRUS TERRESTRIS) IN THE HIGHLY THREATENED

CERRADO BIOME, BRAZIL. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(1), 2020, pp. 34–46. DOI: 10.7589/2018-10-244, 2020.

FERNANDEZ-PACHECO, P.; FERNANDEZ-PINERO, J. A.; JIMINEZ- CLAVERO, M. A. Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain. *Veterinary Record*, 162, 659e660, 2008.

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

FLOCH, H.; ABONNENC, E. Cératopogonides hématophages de la Guyane Française. *Ibid.* 37:1-10, 1942.

FORATTINI, O. P. *Culicoides* da Região Neotropical (Diptera, Ceratopogonidae). *Ibid.* 11:159-526, 1957.

FORATTINI, O. P. Nova espécie de *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) do estado de Goiás, Brasil. *Folia Clinica et Biologica* 21:315-320, 1954.

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.

FRÖLICH, K.; HAMBLIN, C.; JUNG, S.; OSTROWSKI, S.; MWANZIA, J.; STREICH, W. J.; ... ANAJARIYAH, S. Serologic surveillance for selected viral agents in captive and free-ranging populations of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia and the United Arab Emirates. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(1), 67-79. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.1.67>, 2005.

FUNDAÇÃO DE PARQUES MUNICIPAIS E ZOOBOTÂNICA (FPMZB). Livro Ilustrado da Zoobotânica: orientações para visitas Belo Horizonte: ISBN: 978-65-81355-01-2, FPMZB, 2019.

GAUDREAU, N. N.; MAYO, C. E.; JASPERSON, D. C.; CROSSLEY, B. M.; BREITMEYER, R. E.; JOHNSON, D. J.; OSTLUND, E. N.; MACLACHLAN, N. J.; WILSON, W. C. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of Bluetongue virus serotype 2 strains isolated in the Americas including a novel strain from the western United States. *J Vet Diagn Invest.* 2014 Jul;26(4):553-557. doi: 10.1177/1040638714536902. PMID: 24916442, 2014.

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.

GERBER, P. F.; GALINARI, G. C. F.; CORTEZ, A.; PAULA, C. D.; LOBATO, Z. I. P.; HEINEMANN, M. B. Orbivirus infections in collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in Southeastern Brazil. *J Wildl Dis*, 48, 230-232, 2012.

GERBER, P. F.; GALINARI, G. C. F.; CORTEZ, A.; PAULA, C. D.; LOBATO, Z. I. P.; HEINEMANN, M. B. Orbivirus infections in collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in Southeastern Brazil. *J Wildl Dis*, 48, 230-232, 2012.

GOELDI, E. Os mosquitos no Pará. Reunião de quatro trabalhos sobre os mosquitos indígenas, principalmente as espécies que molesta o homem. Memórias do Museu Goeldi (Museu Paraense) de Historia Natural e Ethnographie 4:1-154, 5 pls, 1905.

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

GREINER, E.; MO, C.; TANYA, V.; THOMPSON, L.; OVIEDO, M.; WALTON, T. Interamerican Bluetongue Team. Vector ecology of bluetongue viruses in Central America and the Caribbean. In T. Walton and B. Osburn (eds.), *Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses*, Proceedings of the Second International Symposium, Paris, pp. 320–324, 1992.

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

GUIMARÃES, L. L. B.; ROSA, J. C. C.; MATOS, A. C. D. *et al.* Identification of bluetongue virus serotype 1, 4, and 17 co-infections on sheep flocks during outbreaks in Brazil. *Res Vet Sci*, v. 113, p. 87-93, 2017.

GÜR, S. A serologic investigation of blue tongue virus (BTV) in cattle, sheep and gazella subgutturosa subgutturosa in southeastern turkey. *Trop Anim Health Prod* 40:217–221 DOI 10.1007/s11250-007-9083-4, 2008.

GUSMÃO, G. M. C.; LOROSA, E. S.; BRITO, G. A.; MORAES, L. S.; BASTOS, V. J. C.; REBELO, J. M. M. Determinação das fontes de repasto sanguíneo de *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae) em áreas rurais do norte do estado do Maranhão, Brasil *Biotemas*, 28 (1): 51-58, março de 2015.

HADJ-HENNI, L.; DE MEULEMEESTER, T.; DEPAQUIT, J.; NOËL, P.; GERMAIN, A.; HELDER, R.; AUGOT, D. Comparison of vertebrate cytochrome b and prepronociceptin for blood meal analyses in *Culicoides*. *Front. Vet. Sci.* 2:15. doi: 10.3389/fvets.2015.00015, 2015.

HAMBLIN, C.; ANDERSON, E. C.; JAGO, M.; MLENGEYA, T.; HIRJI, K. Antibodies to some pathogenic agents in free-living wild species in Tanzania. *Epidemiol. Infect.* Vol. 105, n.3, 585-594. 1990. Publicado online pela Imprensa da Universidade de Cambridge em 2009. Available in < <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/antibodies-to-some-pathogenic-agents-in-freeliving-wild-species-in-tanzania/BA2A8A2E0E03449D92C4C6D537B26FE2> >

HARRUP, L. E. The Pirbright Institute *Culicoides* DNA Barcoding Protocols, Ver. 2, DOI: 10.13140/RG.2.1.5026.2642, 2014.

HARRUP, L. E. The Pirbright Institute *Culicoides* DNA Barcoding Protocols, Version 3. 3ed. 2018.

HEMATI, B.; CONTRERAS, V.; URIEN, C.; BONNEAU, M.; TAKAMATSU, H-H.; MERTENS, P. P. C.; BREARD, E.; SAILLEAU, C.; ZIENTARA, S.; SCHWARTZ-CORNIL, I. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *Journal of Virology* 83, 8789–8799, 2009.

HENNING, M. W. Animal Diseases in South Africa, 3<sup>rd</sup> Edit., Central News Agency, South Africa. 809e827, 1956.

HENRICH, M.; REINACHER, M.; HAMANN, H. P. Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Veterinary Record* 161, 764, 2007.

HOPKEN, M. W.; RYAN, B. M.; HUYVAERT, K. P.; PIAGGIO, A. J. Picky eaters are rare: DNA-based blood meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) species from the United States. *Parasites & Vectors* 10:169. DOI 10.1186/s13071-017-2099-3, 2017.

HOUSE, J.A., GROOCOCK, C.M. & CAMPBELL, C.H. Antibodies to Bluetongue Viruses in Animals Imported into United States Zoological Gardens. *Can. J. comp. Med.* Vol.46, p. 154-159, 1982(Abr). Available in < <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CA19830857028> >

HOWERTH, E. W. Cytokine release and endothelial 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. 2021. Disponível em: <[https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202104877](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202104877)>. Acessado em: 06/12/2022

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1, 2020. Available in < [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) > Downloaded in 25/10/2020>

JAUNIAUX, T. P.; CLERCQ, K. E. D.; CASSART, D. E.; KENNEDY, S.; VANDENBUSSCHE, F. E.; VANDEMEULEBROUCKE, E. L.; VANBINST, T. M.; VERHEYDEN, B. I.; GORIS, N. E.; COIGNOUL, F. L. Bluetongue in Eurasian Lynx. *Emerging Infectious Diseases*. < [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) > Vol. 14, No. 9, (Set), 2008.

KAMEKE, D., KAMPEN, H., WACKER, A.; WERNER, D.. Field studies on breeding sites of *Culicoides* LATREILLE (Diptera: Ceratopogonidae) in agriculturally used and natural habitats. *Sci Rep* 11, 10007 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86163-9>

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

KAWANAMI, A. E. Vírus da língua azul em cervídeos neotropicais e bovídeos domésticos. 99 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual, São Paulo, Jaboticabal, 2017.

KAWANAMI, A. E.; DE OLIVEIRA, J. P.; ARENALES, A.; CROSSLEY, B.; WOODS, L. W.; DUARTE, J.M.B.; WERTHER, K. Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. *Pesq. Vet. Bras.* Rio de Janeiro, Vol.38, no.1, 2018(Jan). Available in < <https://www.scielo.br/j/pvb/a/HqvdfGtV4x8rrPJmYfZ7XYy/?format=pdf&lang=en> >

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.

KIRKLAND, P. D.; MELVILLE, L. F.; HUNT, N. T.; WILLIAMS, C. F.; DAVIS, R. J. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. *Veterinaria Italiana* 40, 497–501, 2004.

KOUMBATI, M.; MANGANA, O.; NOMIKOU, K.; MELLOR, P. S.; PAPADOPOULOS, O. Duration of bluetongue viremia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 64, 277–285, 1999.

LABUSCHAGNE, K.; GERBER, L.J.; ESPIE, I.; CARPENTER, S. *Culicoides* biting midges at the National Zoological Gardens of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 74: 343–347, 2007.

LAENDER, J. O.; RIBEIRO, E. S.; GOUBEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; FELIPPE-BAUER, M. L. F. Levantamento das espécies de *Culicoides* latreille, 1809 (diptera: ceratopogonidae) encontradas nas mesorregiões norte de minas, jequitinhonha e vale do mucuri, minas gerais, brasil. *Entomol. Vect.* 11 (1): 145-157, 2004

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

LARSKA, M.; GROCHOWSKA, M.; LECHOWSKI, L.; ZMUDZINSKI, J. F. Abundance and species composition of *Culicoides* spp. biting midges near cattle and horse in south-eastern Poland. *Acta Parasitologica*, v. 62, n. 4, 2017.

LIMA, P. A.; UTIUMI, K. U.; YUMI, K.; BIHRER, N. R. ALBUQUERQUE, A. S.; REZENDE, F. S. MATOS A. C. D.; LOBATO, Z. I. P., PECONICK D. D. A. P.; VARASCHIN, M. S.; RAYMUNDO, D. L. Diagnoses of ovine infection by the serotype-4 bluetongue virus on Minas Gerais, Brazil. *Acta Sci Vet* 44:1–5, 2016.

LINLEY JR, ADAMS GM. A study of the mating behaviour of *Culicoides melleus* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). *Trans R Entomol Soc Lond.* 1972;124:81–121.

LIZCANO, D.; ALVAREZ, S. J. *Mazama rufina*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T12914A22165586. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-.RLTS.T12914A22165586.en.>, 2016. Accessed on 13 December 2022.

LOBATO, Z. I.; COUPAR, B. E.; GRAY, C. P.; LUNT, R.; ANDREW, M. E. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 59, 293–309, 1997.

LOBATO, Z.I.P.; GUEDES, M.I.M.C.; MATOS, A.C D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. *Veterinaria Italiana*. Roma, 51(4), p. 253-262, 2015. Available in < [https://www.izs.it/vet\\_italiana/2015/51\\_4/Vettit\\_600\\_2892\\_1.pdf](https://www.izs.it/vet_italiana/2015/51_4/Vettit_600_2892_1.pdf) >

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

LUTZ, A. Contribuição para o estudo das ceratopogoninas hematofagas do Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 5:45–73, pls. 6–8. doi: 10.1590/s0074-02761913000100005, 1913.

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.; NOMIKOU, K.; JOHNSON, D.J.; EL HARRAK, M.; MADANI, H.; YADIN, H.; INCOGLU, S.; YESILBAG, K.; ALLISON, A.B.; STALLKNECHT, D.E.; BATTEN, C.; ANTHONY, S.J.; MERTENS, P.P.C. RT PCR assays for seven serotypes of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus and their use to type strains from the mediterranean region and North America. *PLoS ONE*, Vol.5(9), 2010. Available in < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2941451/> >

MAAN, N.S.; MAAN, S.; POTGIETER, A.C.; WRIGHT, I.M.; BELAGANAHALLI, M.; MERTENS, P.P.C. Development of Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *Transbound. Emerg. Dis.*, Vol.64(4), p. 1120–1132, 2017. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26888716/> >

MAAN, S.; MAAN, N.S.; BELAGANAHALLI, M.N.; RAO, P.P.; SINGH, K P.; HEMADRI, D.; PUTTY, K.; KUMAR, A.; BATRA, K.; KRISHNAJYOTHI, Y. Full-Genome Sequencing as a Basis for Molecular Epidemiology Studies of Bluetongue Virus in India. *PLoS ONE*, vol. 10(6), 2015. Available in < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131257> >

MAAN, S.; MAAN, N.S.; NOMIKOU, K.; VERONESI, E.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BELAGANAHALLI, M.N.; ATTOUI, H.; MERTENS, P.P. Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS ONE*, vol 6(10), 2011. Available in < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026147>>

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.; CRAFFORD, J. E.; VERNAU, W.; GARDNER, I. A.; GODDARD, A.; *et al.* Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Veterinary Pathology*, 45, 310e315, 2008.

MACLACHLAN, N.J.; DREW, C.P.; DARPEL, K.E.; WORWA, G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.*, vol.141(1), p. 1–16, 2009. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19476953/> >

MACLACHLAN, N.J.; MAYO, C.E.; DANIELS, P.W.; SAVINI, G.; ZIENTARA, S.; GIBBS, E.P.J. Bluetongue. *Rev. Sci. Tech. Off.*, vol.34 (2), p. 329-340, 2015. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26601438/> >

MACLACHLAN, N.J.; ZIENTARA, S.; WILSON, W.C.; RICHT, J.A.; SAVINI, G. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses: recent developments with these globally re-emerging arboviral infections of ruminants. *Current Opinion in Virology*. Vol.34, p. 56–62, 2019. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30654271/> >

MATOS, A. C. D.; ROSA, J. C. C.; NOMIKOU K.; GUIMARÃES, L. L. B.; COSTA, E. A.; GUEDES; M. I. M. C.; DRIEMEIER, D.; LOBATO, Z. I. P.; MERTENS, P. P. C. Genome sequence of Bluetongue virus serotype 17 isolated in Brazil in 2014. *Genome Announc.* Vol.4(5), 2016. Available in < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084861/> >

MATOS, A.C.D.; LONGO, B. C.; PINHERO, M.A. et al. Epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus co-circulation and co-infection in deer of captivity in Brazil. *XXXIX Congresso Brasileiro De Virologia*, Gramado. 2018.

MAUROY, A.; GUYOT, H.; CLERCQ, K.; CASSART, D.; THIRY, E.; SAEGERMAN, C. Bluetongue in Captive Yaks. *Emerging Infectious Diseases* • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 14, No. 4, April 2008.

MAY-JÚNIOR J.A. Avaliação de parâmetros fisiológicos e epidemiológicos da população de anta-brasileira (*Tapirus terrestris*, Linnaeus, 1758) na Mata Atlântica do Parque Estadual Morro do Diabo, Pontal do Paranapanema, São Paulo. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2011.

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

MCGREGOR, B. L.; STENN, T.; SAYLER, K. A.; BLOSSER, E. M.; BLACKBURN, J. K.; WISELY, S. M.; BURKETT-CADENA, N. D. Host use patterns of *Culicoides* spp. biting midges at a big game preserve in Florida, U.S.A., and implications for the transmission of orbiviruses. *Med. Vet. Entomol.* 33: 110–120, 2019.

MCGREGOR, B. L.; ERRAM, D.; ALTO, B. W.; LEDNICKY, J. A.; WISELY, S. M.; BURKETT-CADENA, N. D. Vector Competence of Florida *Culicoides* insignis (Diptera: Ceratopogonidae) for Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype-2. *Viruses*, v. 13, n. 3, p. 410, 2021. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33807536/> >

MCGREGOR, B. L.; SHULTS, P. T.; MCDERMOTT, E. G. A Review of the Vector Status of North American *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) for Bluetongue Virus, Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, and Other Arboviruses of Concern. *Current Tropical Medicine Reports* 9:130–139. <https://doi.org/10.1007/s40475-022-00263-8>, 2022.

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.

MEISWINKEL, R.; GOMULSKI, L. M.; DELECOLLE, J. C.; GOFFREDO, M.; GASPERI, G. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes e unfinished business. *Veterinaria Italiana*, 40, 151e159, 2004.

MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* 45, 307-340, 2000.

MELLOR, P. S.; CARPENTER, S; WHITE, D. M. Bluetongue virus in the insect host. *Bluetongue: Biology of animal infections*. Ed. 1, London: Elsevier. Chapter 14, 295p to 320p, 2009.

MERCER, D. R.; SPINELLI, G. R.; WATTS, D. M.; TESH, R. B. Biting rates and developmental substrates for biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Iquitos, Peru. *J. Med. Entomol.* 40 (6): 807-812, 2003.

MERTENS P. P. C; DUNCAN R; ATTOUI H; DERMODY T. S. Reoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, and Ball LA (eds.) *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego (CA), Elsevier Academic Press. p. 447–454, 2005(a).

MEYER, G.; LACROUX, C.; LEGER, S.; TOP, S.; GOYEAU, K.; et al. Lethal bluetongue virus serotype 1 infection in llamas. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 608e610, 2009.

MILLS, M. K.; RUDER, M. G.; NAYDUCH, D.; MICHEL, K.; DROLET, B. S. Dynamics of epizootic hemorrhagic disease virus infection within the vector, *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *PLoS ONE*, vol. 12(11), 2017. Available in < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188865> >

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa No 50, De 24 De Setembro De 2013.

MO, C. L.; THOMPSON, L. H.; HOMAN, E. J.; OVIEDO, M. T.; GREINER, E. C.; GONZALEZ, J.; SAENZ, M. R. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerican Bluetongue Team. *Am J Vet Res*, 55, 211-215, 1994.

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

MORALO, R. G.; CATÃO-DIAS, José Luiz; ARITA, Gonçala Maria Martins. Ocorrência de doença hemorrágica em cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Anais. Sorocaba: [s.n.], 1995.

MORE, S.; BICOUT, D.; BØTNER, A.; BUTTERWORTH, A.; DEPNER, K.; EDWARDS, S.; GARIN-BASTUJI, B.; GOOD, M.; SCHMIDT, C. G.; MICHEL, V.; MIRANDA, M. A.; NIELSEN, S. S.; RAJ, M.; SIHVONEN, L.; SPOOLDER, H.; STEGEMAN, J. A.; THULKE, H-H.; VELARDE, A.; WILLEBERG, P.; WINCKLER, C.; MERTENS, P.; SAVINI, G.; ZIENTARA, S.; BROGLIA, A.; BALDINELLI, F.; GOGIN, A.; KOHNLE, L.; CALISTRI, P. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): bluetongue. *EFSA Journal*, Agosto, 2017. Disponível em <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4957> >

MORIKAWA, V. M.; PELLIZZARO, M.; PAPLOSKI, I. A.; KIKUTI, M.; LARA, M. C.; OKUDA, L. H.; ... BARROS FILHO, I. R. Serosurvey of bluetongue, caprine arthritis-encephalitis (CAE) and Maedi-Visna in Barbary sheep (*Ammotragus lervia*) of a southern Brazilian zoo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(6), 1203-1206. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4590>, 2018.

MULLEN, G. R. Biting midges (Ceratopogonidae). In: Mullen G, Durden L, editors. *Medical and Veterinary Entomology*. pp. 163-183. Academic Press, 2002.

MULLEN, G. R.; HAYES, M. E.; NUSBAUM, K. E. Potential vectors of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses of cattle and white-tailed deer in Alabama. *Prog Clin Biol Res.*;178:201-6, 1985(a).

MULLEN, G. R., JONES RH, BRAVERMAN Y, NUSBAUM KE. Laboratory infections of *Culicoides debilipalpis* and *C. stellifer* (Diptera: Ceratopogonidae) with bluetongue virus. *Prog Clin Biol Res.*;178:239-43, 1985(b).

NELDER, M. P.; SWANSON, D. A.; ADLER, P. H.; GROGAN, W. L. Biting midges of the genus *Culicoides* in South Carolina zoos. *Journal of Insect Science* 10:55 available online: [insectscience.org/10.55](http://insectscience.org/10.55), 2010.

NIEDBALSKI, W. Bluetongue in Europe and the role of wildlife in the epidemiology of disease. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 18, No. 2, p. 455-461, 2015

NOL, P.; KATO, C.; REEVES, W. K.; RHYAN, J.; SPRAKER, T.; GIDLEWSKI, T.; VERCAUTEREN, K.; SALMAN, M. Epizootic Hemorrhagic Disease Outbreak in a Captive Facility Housing White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*), Bison (*Bison bison*), Elk (*Cervus elaphus*), Cattle (*Bos taurus*), and Goats (*Capra hircus*) in Colorado, *USA Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(3), p.510-515, 2010. Available in <<https://in.booksc.org/book/30744327/5c0874> >

OBERST, R. D.; STOTT, J. L.; BLANCHARD-CHANNELL, M.; OSBURN, B. I. Genetic reassortment of bluetongue virus serotype 11 strains in the bovine. *Veterinary Microbiology*, 15, 11e18, 1987.

Office International Epizooties (OIE). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, OIE Standards Commission (Eds.), sixth ed. 2008.

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

ORRÙ, G.; FERRANDO, M. L.; MELONI, M.; LICIARDI, M.; SAVINI, G.; DE SANTIS, P. Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *Journal of Virological Methods*, 137(1), p. 34-42, 2006.

ORTEGA, J.; CROSSLEY, B.; DECHANT, J. E.; DREW, C. P.; MACLACHLAN, N. J. Fatal bluetongue virus infection in an alpaca (*Vicugna pacos*) in California. *J Vet Diagn Invest*. 2010 Jan;22(1):134-6. doi: 10.1177/104063871002200129. PMID: 20093703, 2010.

ORTÍZ, I. Estudios en *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). IX. Sobre los caracteres diferenciales entre *Culicoides paraensis* (Goeldi, 1905), *C. stellifer* (Coquillett, 1901), y *C. lanei* (Ortiz, 1950). Descripción de cuatro nuevas especies con la redescipción de algunas otras poco conocidas. *Ibid.* 16:573-591, 1951.

ORTÍZ, I.; MIRSA, M. Estudios en *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) VIII.- Sobre una nueva especie del grupo haematopotus: *Culicoides venezuelensis* n. sp. *Archivos Venezolanos de Patología Tropical y Parasitología Médica* 2:137-143, 1950.

OSBURN, B. I. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 17, 189-196, 1994.

- PANDOLFI, J. R. C. Língua Azul e Doença Epizoótica Hemorrágica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres. 68 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – patologia veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 1999.
- PANDOLFI, J. R. C.; TAMANINI, M. L. F.; ARAUJO, J. P.; DUARTE, J. M. B.; ANDERSON, J.; THEVASSAGAYAM, J. Presence of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease of deer virus in a population of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) living in southwest of São Paulo and in Northeast of Mato Grosso do Sul states, in Brazil. *Virus Rev Res*, 3, S56, 1998.
- PÉREZ, J. R. Revisión de los dípteros hematófagos del género *Culicoides* em Venezuela. *Boletín de la Direccion de Malaria y Saneamiento Ambiental*. Vol. XXIV, n° 1-4, 1984.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; ISHAK, R.; FREITAS, R. B.; GOMES, M. L. C.; LeDUC, J. W.; OLIVA, O. F. P. Oropouche virus: I - A review of clinical, epidemiological and ecological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(1) 149-160, 1981.
- PINHEIRO, M. A. Diagnóstico laboratorial da doença hemorrágica epizoótica em cervídeos brasileiros. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais Área de concentração: Ciência Animal. 93p:il, 2019.
- PINHEIRO, R.R.; SOUZA, T.S.; FEITOSA, A.L.V.L.; ARAGÃO, M.A.C.; LIMA, C.C.V.; COSTA, J.N.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M.F.S.; BRITO, R.L.L. *Frequência De Anticorpos Contra O Vírus Da Língua Azul Em Ovinos Do Estado Do Ceará, Brasil*. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.80, n.1, p.35-42, jan. /mar., 2013.
- PINI, A. Study on the pathogenesis of bluetongue: replication of the virus in the organs of infected sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 43, 159e164, 1976.
- PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Mapa. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/jardim-zoologico/mapa>> Acesso em: 30/11/2021
- 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.
- PURSE, B. V.; CARPENTER, S.; VENTER, G. J.; BELLIS, G.; MULLENS, B. A. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annu Rev Entomol.* 2015; 60:373–92, 2015.
- PURSE, B. V.; MELLOR, P. S.; ROGER, D. J.; SAMUEL, A. R.; MERTENS, P. P.; *et al.* Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 171e181, 2005.
- 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.
- RAO, P. P.; HEGDE, N. R.; SINGH, K. P.; PUTTY, K.; HEMADRI, D.; MAAN, N. S.; ... MERTENS, P. P. Bluetongue: Aetiology, epidemiology, pathogenesis, diagnosis and control. In *Emerging and Reemerging Infectious Diseases of Livestock* (pp. 3-54). Cham: Springer, 2017.
- REBÊLO, J. M. M.; RODRIGUES, B. L.; BANDEIRA, M. C. A.; MORAES, J. L. P.; FONTELES, R. S.; PEREIRA, S. R. F. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. *Journal of Vector Ecology* 41 (2): 303-308, 2016.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, v. 1, n. 27, p. 493–497, 1938.
- RIDDIN, M. A.; VENTER, G. J.; LABUSCHAGNE, K.; VILLET, M. H. Bloodmeal analysis in *Culicoides* midges collected near horses, donkeys and zebras in the Eastern Cape, South Africa. *Med. Vet. Entomol.* 33, 467–475. <https://doi.org/10.1111/mve.12381>, 2019.
- RIES, C.; VÖGTLIN, A.; HÜSSY, D.; JANDT, T.; GOBET, H.; HILBE, M.; BURGNER, C.; SCHWEIZER, L.; HÄFLIGER-SPEISER, S.; BEER, M.; *et al.* Putative Novel Atypical BTV Serotype '36' Identified in Small Ruminants in Switzerland. *Viruses* 13, 721. <https://doi.org/10.3390/v1305072>, 2021.
- RIOS, R. R. S.; SANTARÉM, M. C. A.; RIBEIRO JÚNIOR, K. A. L.; DE MELO, B. A.; DA SILVA, S. G. M.; DA SILVA, N. C.; DOS SANTOS, V. R. V.; DOS SANTOS, J. M.; SANTANA, A. E. G.; FRAGA, A. B. *Culicoides insignis* Lutz, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) Biting Midges in Northeast of Brazil. *Insects* 2021, 12, 366. <https://doi.org/10.3390/insects12040366>, 2021.
- RIVERA, G. H.; CÁRDENAS, P. L.; RAMÍREZ, V. M.; MANCHEGO, S. A.; MORE B. J.; ZÚÑIGA, H. A.; ROMERO, S. M. Infección por orbivirus en huanganas (*Tayassu pecari*) de Madre de Dios. *Rev Inv Vet Perú*, 24 (4), 544-550, 2013.

- RIVERA, N. A.; VARGA, C.; RUDER, M. G.; DORAK, S. J.; ROCA, A.L.; NOVAKOFSKI, J. E.; MATEUS-PINILLA, N. E. Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in the United States of America at the Wildlife–Livestock Interface. *Pathogens* 10, 915. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080915>, 2021.
- ROMAÑA, C.; WYGODZINSKY, P. Acerca de la Transmisión de *Mansonella Ozzardi* (Manson) (Filaria Tucumana) Biglieri y Araoz. *An Inst Med Reg* 3:29-34, 1950.
- RONDEROS, M. M.; SPINELLI, G. R.; LAGER, I.; DIAZ, F. La importancia sanitaria de los jejenes del genero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en la Argentina. *Entomologia y Vectores*, 10, 601-612, 2003.
- ROY, P. Bluetongue virus structure and assembly. *Curr Opin Virol*, v. 24, p. 115-123, 2017.
- RUDER, M. G.; LYSYK, T. J.; STALLKNECHT, L. D. et al. Transmission and Epidemiology of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in North America: Current Perspectives, Research Gaps, and Future Directions. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v. 15, n. 6, p. 348-363, 2015.
- SABIO, I. J.; MACKAY, A. J.; ROY, A.; FOIL, L. D. Detection of West Nile virus RNA in pools of three species of ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae) collected in Louisiana. *Journal of Medical Entomology* 43: 1020- 1022, 2006.
- SAEGERMAN, C.; BOLKAERTS, B.; BARICALLA, C.; RAES, M.; WIGGERS, L.; DE LEEUW, I.; VANDENBUSSCHE, F.; ZIMMER, J. Y.; HAUBRUGE, E.; CASSART, D. The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype 8 infection on reproductive performance in sheep. *Veterinary Journal* 187, 72–80, 2011.
- SAILLEAU, C.; BREARD, E.; VIAROUGE, C.; BELBIS, G.; LILIN, T.; VITOUR, D.; ZIENTARA, S. Experimental infection of calves with seven serotypes of Epizootic Hemorrhagic Disease virus: production and characterization of reference sera. *Vet Ital.* V. 55(4), p. 339-346, 2019. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31955556/> >
- SAILLEAU, C.; ZANELLA, G.; BREARD, E.; VIAROUGE, C.; DESPRAT, A.; VITOUR, D.; ADAM, M.; LASNE, L.; MARTRENCAR, A.; BAKKALI-KASSIMI, L.; COSTES, L.; ZIENTARA, S. *Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island.* 155(2-4), 191–197. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.006, 2012.
- SAMINATHAN, M.; SINGH, K. P.; KHORAJIYA, J. H.; DINESH, M.; VINEETHA, S.; MAITY, M.; RAHMAN, A. T. F.; MISRI, J.; MALIK, Y. S.; GUPTA, V. K.; SINGH, R. K.; DHAMA, K. An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Veterinary Quarterly*, VOL. 40, No. 1, p.258–321, 2020. Available in < <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01652176.2020.1831708> >
- SÁNCHEZ ROMANO, J.; GRUND, L.; OBIEGALA, A.; NYMO, I. H.; ANCIN MURGUZUR, F. J.; LI, H.; ... TRYLAND, M. A Multi-Pathogen Screening of Captive Reindeer (*Rangifer tarandus*) in Germany Based on Serological and Molecular Assays. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 461. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00461>, 2019.
- SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B.; RISALDE, M. A.; MOLINA, V.; PEDRERA, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M.; GÓMEZ-VILLAMADOS, J. C. Immunohistochemical Detection of Bluetongue Virus in Fixed Tissue. *J. Comp. Path.* Vol.143, p.20-28, 2010. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20156627/> >
- SANTARÉM, M. C. A. FELIPPE-BAUER, M. L. Brazilian species of biting midges: Espécies de maruins do Brasil. *Fiocruz*, p. 67, 2020.
- SANTARÉM, M. C.; FELIPPE-BAUER, M. L. Brazilian species of biting midges — espécies de maruins do Brasil (Diptera: Ceratopogonidae). *Fundação Oswaldo Cruz*. Accessed at <https://portal.fiocruz.br/sites/portal>, 2021.
- SANTIAGO-ALARCON, D.; HAVELKA, P.; PINEDA, E.; SEGELBACHER, G.; SCHAEFER, H. M.; Urban forests as hubs for novel zoonosis: Blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians. *Parasitology* 140, 1799–1810. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001285>, 2013.
- SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; VAN WUIJKHUISE, L.; VELLEMA, P.; VAN RIJN P. A. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 in Dutch dairy herds in 2007. *Veterinary Microbiology* 141, 31–35, 2010.
- SAVINI, G.; AFONSO, A.; MELLOR, P.; ARADAIB, I.; YADIN, H.; SANAA, M.; WILSON, W.; MONACO, F.; DOMINGO, M. Epizootic heamorrhagic disease. *Research in Veterinary Science*, vol.91(1), p. 1–17, 2011. Available in < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528811001780> >
- SCHULZ, C.; ESCHBAUMER, M.; RUDOLF, M.; KÖNIG, P.; KELLER, M.; BAUER, C.; GAULY, M.; GREVELDING, G. C.; BEER, M.; HOFFMANN, B. Experimental infection of South American camelids with bluetongue virus serotype 8. *Vet Microbiol*, 154, 257-265, 2012.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P. P. C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BR EARD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.J.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis, and immunity. *Vet. Res.* 39, p.46, 2008. Available in < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18495078/> >

SHERLOCK I.A. O problema do *Culicoides* em Salvador, Bahia. *Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais.* 15(4):567-591, 1963.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Dermatozoonosis by *Culicoides*' bite (Diptera, Ceratopogonidae) in Salvador, State of Bahia, Brasil. 3. Epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 63(1): 1-12, 1965.

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

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.

SINGER, R. S.; BOYCE, W. M.; GARDNER, I. A.; JOHNSON, W. O.; FISHER, A. S. Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. *Prev Vet Med*, 35, 265-282, 1998.

SMITH, K. E.; STALLKNECHT, D. E. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) collected during epizootics of hemorrhagic disease among captive white-tailed deer. *J Med Entomol.* 1996; 33:507–10. [https:// doi. org/ 10. 1093/ jmede nt/ 33.3. 507](https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.507), 1996.

SMITH, K. E.; STALLKNECHT, D. E.; NETTLES, V. F.; Experimental Infection of *Culicoides lahillei* (Diptera: Ceratopogonidae) with Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 2 (Orhivirus: Reoviridae), *Journal of Medical Entomology*, Volume 33, Issue 1, 1 January 1996, Pages 117–122, <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.1.117>, 1996.

SMITH, K. M.; MACHALABA, C. M.; JONES, H.; CÁCERES, P.; POPOVIC, M.; OLIVAL, K. J.; JEBARA, K. B.; KARESH, W. B. Wildlife hosts for OIE-Listed diseases: considerations regarding global wildlife trade and host–pathogen relationships. *Veterinary Medicine and Science*, vol.3, pp. 71–81, 2017.

SNYMAN, J.; SNYMAN, L. P.; LABUSCHAGNE, K.; VENTER, G. J.; VENTER, M. The utilisation of CytB and COI barcodes for the identification of bloodmeals and *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) reveals a variety of novel wildlife hosts in South Africa 219 105913, 2021.

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

SPERLOVA, D. Z. Bluetongue: a review. *Veterinari Medicina*, 56, (9): 430–452, 2011.

SPICKLER, Anna Rovid. *Bluetongue*. 2015. Available in < <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>. >

SPICKLER, Anna Rovid. *Epizootic Hemorrhagic Disease*. 2019. Available in < <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>. >

SPINELLI, G. R.; GREINER, E. C.; WIRTH, W. W. The Neotropical bloodsucking midges of the *Culicoides guttatus* group of the subgenus *Hoffmania* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contributions of the American Entomological Institute* 27(3): 1-91, 1993.

SPINELLI, G. R.; WIRTH, W. W. Ocho especies nuevas del genero *Culicoides* Latreille de la region Neotropical. Primera descripcion del macho de *C. flinti* Wirth, y de la hembra de *C. lenti* Tavares y Luna Dias (Diptera: Ceratopogonidae). *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* 43:171-185, 1984.

SPREULL, J. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 18, 321–337, 1905.

STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W. Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. *Veterinaria Italiana*, vol. 40 (3), p. 203-207, 2004. Available in < [https://www.researchgate.net/publication/43343973\\_Epidemiology\\_of\\_bluetongue\\_and\\_epizootic\\_haemorrhagic\\_disease\\_in\\_wildlife\\_surveillance\\_methods](https://www.researchgate.net/publication/43343973_Epidemiology_of_bluetongue_and_epizootic_haemorrhagic_disease_in_wildlife_surveillance_methods) >

SWANSON, D. A.; KAPALDO, N. O.; MAKI, E.; CARPENTER, J. W.; COHNSTAEDT, L. W. DIVERSITY AND ABUNDANCE OF NONCULICID BITING FLIES (DIPTERA) IN A ZOO ENVIRONMENT. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 34(4):265–271, 2018

TABACHNICK, W. J. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *The Journal of Experimental Biology* 213, 946-954 ©. Published by The Company of Biologists Ltd doi:10.1242/jeb.037564, 2010.

- TABACHNICK, W.J. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet Ital.* 2004 Jul-Sep;40(3):144-50. PMID: 20419653, 2004.
- TAVARES, O.; DE SOUZA, M. A. Sobre algumas espécies do genero *Culicoides* Latreille, 1809 do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Diptera, Ceratopogonidae). *Ibid.* 39:611-613, 1979.
- THEVASAGAYAM, J. A.; MERTENS, P. P.; BURROUGHS, J. N.; ANDERSON, J. Competitive ELISA for the detection of antibodies against epizootic haemorrhagic disease of deer virus. *J Virol Methods*, vol. 55, p. 417-425, 1995.
- THORNE, E. T.; WILLIAMS, E. S.; SPRAKER, T. R.; HELMS, W.; SEGERSTROM, T. Bluetongue in free-ranging pronghorn antelope (*Antilocapra americana*) in Wyoming: 1976 and 1984. *J Wildl Dis*, 24 (1), 113-119, 1988.
- TOBE, S. S.; KITCHENER, A. C.; LINACRE, A. M. T. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *PLoS ONE* 5(11): e14156. doi: 10.1371/journal.pone.0014156, 2010.
- 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.
- VARELA, D., FLESHER, K., CARTES, J.L., DE BUSTOS, S., CHALUKIAN, S., AYALA, G. & RICHARD-HANSEN, C. 2019. *Tapirus terrestris*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T21474A45174127. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T21474A45174127.en>. Accessed on 31 January 2023.
- VASCONCELOS, H. B.; AZEVEDO, R. S. S.; CASSEB, S. M.; NUNES-NETO, J. P.; CHIANG, J. O.; CANTUÁRIA, P. C. *et al.* Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virology* 44:129-133, 2008.
- VENTER, G. J.; LABUSCHAGNE, K.; BOIKANYO, S. N. B.; MOREY, L. The effect of high frequency sound on *Culicoides* numbers collected with suction light traps. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 83, 1–6. <https://doi.org/10.4102/jsava.v83i1.10>, 2012.
- VERONESI, E.; VENTER, G. J.; LABUSCHAGNE, K.; MELLOR, P. S.; CARPENTER, S. Life-history parameters of *Culicoides* (*Avaritia*) *imicola* Kieffer in the laboratory at different rearing temperatures. *Veterinary Parasitology* 163, 370–373, 2009.
- VERWOERD, D. W.; ERASMUS, B. J. Bluetongue. In: *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd Edit., JACoetzer and RCTustin, Eds, Oxford Press, Cape Town, pp. 1201e1220, 2004.
- VIAROUGE, C.; LANCELOT, R.; RIVES, G.; BRÉARD, E.; MILLER, M.; BAUDRIMONT, X.; DOCEUL, V.; VITOUR, D.; ZIENTARA, S.; SAILLEAU, C. Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. *Vet Microbiol.* 2014 Nov 7; 174(1-2):78-85. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.006, 2014.
- VILAR, M. J.; GUIZ, H.; KRZYWINSKI, J.; SANDERSON, S.; BAYLIS, M. *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Chester Zoo. *Veterinary Record* 168, 242 doi: 10.1136/vr.c6684, 2011.
- 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.
- WERNER, D., GROSCHUPP, S., BAUER, C., & KAMPEN, H. (2020). *Breeding Habitat Preferences of Major Culicoides Species (Diptera: Ceratopogonidae) in Germany. International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 5000. doi:10.3390/ijerph17145000
- WILBUR, L. A.; EVERMANN, J. F.; LEVINGS, R. L.; STOLL, I. R.; STARLING, D. E.; *et al.* Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, 407e408, 1994.
- WILLIAMS, R.W. Observations on habitats of *Culicoides* larvae in Trinidad, WI. (Diptera: Ceratopogonidae). *Ann of Entomol Soc Am.* 57:462, 1964.
- 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, A.; MELLOR, P. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitology Research*, 103, S69eS77, 2008.
- WILSON, W. C.; RUDER, M. G.; JASPERSON, D.; SMITH, T. P.; NARAGHI-ARANI, P.; LENHOFF, R.; STALLKNECHT, D. E.; VALDIVIA-GRANDA, W. A.; SHEORAN, D. Molecular evolution of epizootic hemorrhagic disease viruses in North America based on historical isolates using motif fingerprints. *Virus Genes*. 2016 Aug;52(4):495-508. doi: 10.1007/s11262-016-1332-z. Epub 2016 Apr 23. PMID: 27107856, 2016.

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.

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

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

WORK, T. M.; JESSUP, D. A.; SAWYER, M. M. Experimental bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus infection in California black-tailed deer. *J Wildl Dis*, 28 (4), 623-628, 1992.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). 2019a. Epizootic haemorrhagic disease (infection with epizootic hemorrhagic disease virus). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019*. Available in < <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> >

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). 2019b. Bluetongue (infection with bluetongue virus). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019*. Available in < <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestris>>

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1: SISBIO.

#### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80725-1	Data da Emissão: 12/11/2021 08:12:32	Data da Revalidação*: 12/11/2022
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.		

Nome: Zélia Inês Portela lobato	CPF: 528.123.596-68
Dados do titular S I S B I O	
Título do Projeto: Estudo do vírus da língua azul (VLA) e vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH) em ruminantes do Jardim Zoológico de Belo Horizonte	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais	
CNPJ: 17.217.985/0001-04	

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Pesquisa bibliográfica	10/2021	11/2025
2	Teste de IDGA	11/2021	11/2025
3	qRT-PCR	11/2021	11/2025
4	Imuno-histoquímica e Histopatologia	11/2021	11/2025
5	Estudo epidemiológico	10/2022	11/2025
6	Análise dos resultados e escrita de artigos	10/2022	11/2025
7	Coleta de amostras	12/2021	11/2025

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	EDUARDO ALVES CAIXETA	Pesquisador	103.178.616-38	Brasileira
2	Renato de Lima Santos	Co-orientador	071.522.838-26	Brasileira

#### Observações e ressalvas

1	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
2	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros)
4	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.
5	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.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80725-1	Data da Emissão: 12/11/2021 08:12:32	Data da Revalidação*: 12/11/2022
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.		

Nome: Zélia Inês Portela lobato	CPF: 528.123.596-68
Dados do titular S I S B I O	
Título do Projeto: Estudo do vírus da língua azul (VLA) e vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH) em ruminantes do Jardim Zoológico de Belo Horizonte	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais	CNPJ: 17.217.985/0001-04

### Observações e ressalvas

7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	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.

9	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	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 infraestrutura da unidade.

### Outras ressalvas

1		CENAP Atibaia-SP
---	--	------------------

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	Belo Horizonte-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal

### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lama glama	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ceratotherium simum	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Kobus ellipsiprymnus	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Dama dama	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Camelus dromedarius	-

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80725-1	Data da Emissão: 12/11/2021 08:12:32	Data da Revalidação*: 12/11/2022
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.		

Nome: Zélia Inês Portela lobato	CPF: 528.123.596-68
---------------------------------	---------------------

Dados do titular S I S B I O	
Título do Projeto: Estudo do vírus da língua azul (VLA) e vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH) em ruminantes do Jardim	
Zoológico de Belo Horizonte	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais	CNPJ: 17.217.985/0001-04

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Equus quagga	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Oryx gazella	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Subulo gouazoubira	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Tapirus terrestris	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Blastocerus dichotomus	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cervus elaphus	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80725-1	Data da Emissão: 12/11/2021 08:12:32	Data da Revalidação*: 12/11/2022
<p>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</p> <p>Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.</p>		

Nome: Zélia Inês Portela lobato	CPF: 528.123.596-68
---------------------------------	---------------------



## 8.2. Anexo 2: Autorização Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG.

### 1 Projeto

**1.1 Finalidade:** Pesquisa

**1.2 Título:** Estudo do vírus da língua azul (VLA) e vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH) em ruminantes do Jardim Zoológico de Belo Horizonte

**1.3 Título em inglês:** Study of Bluetongue Virus (BTV) and Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV) in ruminants from the Belo Horizonte Zoo

**1.4 Início:** 10/01/2022

**1.5 Término:** 30/11/2025

**1.6 Experiência do responsável (em anos):** 20

**1.7 Grande área:** CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**1.8 Área:** MEDICINA VETERINÁRIA

**1.9 Subárea:** MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

**1.10 Especialidade:** DOENÇAS INFECCIOSAS DE ANIMAIS

**1.11 Resumo:** No ano de 2020, foi identificado e confirmado um cervídeo do Jardim Zoológico de Belo Horizonte positivo para o vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH), o que levanta uma série de preocupações, como se mais algum animal possa estar infectado, como este vírus foi inserido neste ambiente e a quanto tempo ele está circulando neste local. Desta forma se faz necessário um estudo aprofundado da real extensão deste problema. Além disto, devido a sua similaridade com o vírus da língua azul (VLA) é necessário a investigação de ambos os vírus como diagnóstico diferencial. Tanto o VDEH quanto o VLA são conhecidos por causarem surtos e levarem diferentes espécies de ruminantes ao óbito, além disto ambos são de notificação obrigatória para a organização mundial da saúde (OIE), já existem alguns grupos de pesquisa focados no estudo destas doenças e já foram identificados uma variedade de sorotipos de VLA e dois sorotipos de VDEH no Brasil. Desta forma, é imprescindível a realização de um estudo epidemiológico do local para ambos os vírus, de forma que seja possível eventualmente ser aplicadas medidas de controle e prevenção, especialmente as voltadas para o controle dos *Culicoides*, vetores de ambas as doenças. Amostras de sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador, assim como soro e plasma, coletadas durante procedimentos de rotina e do banco de amostras do zoológico serão encaminhadas Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da UFMG (LPVA). Além destas amostras, caso algum animal venha a óbito, durante o período do estudo, com sinais sugestivos para VLA e VDEH, será realizada a necropsia e serão coletadas cerca de duas gramas de amostras de baço, pulmão, linfonodos, fígado, medula óssea vermelha e coração, e caso ocorra algum aborto ou animal natimorto será coletado pré-colostro, além das amostras já citadas. Parte destas amostras serão colocadas em formol para realização de exame de histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) para VLA e VDEH e outra porção será refrigerada para que seja realizado qRT-PCR e posteriormente realizar isolamento viral caso a amostra seja positiva no teste molecular. As amostras de sangue recebidas do zoológico serão centrifugadas e o soro ou plasma, dependendo do tipo de tubo utilizada, será separado e armazenado. Nos tubos de EDTA, parte das hemácias será separada para, caso a amostra seja positiva para qRT-PCR seja realizado o isolamento viral, o restante das hemácias será lavado e armazenado para caso seja necessário a realização do qRT-PCR. O soro ou plasma serão submetidos ao teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) para diagnóstico de quais são soropositivos para VLA e/ou VDEH. O isolamento viral das amostras virêmicas será realizado em células KC e em seguida será realizado o sequenciamento para a identificação do sorotipo. Também serão realizados testes de Imuno-histoquímica e Histopatologia em amostras provenientes do Jardim Zoológico de Belo Horizonte, de ruminantes que morreram com suspeitas de doença hemorrágica, guardadas no Banco de Tecidos do setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG. Além disto será realizada a coleta e identificação de *Culicoides* spp., grupo de dípteros vetores do VLA e VDEH. Serão coletados dados geoespaciais e climáticos de todas as capturas de *Culicoides*, dos animais soropositivos VLA e/ou VDEH e dos casos de animal que venha a óbito com sinais por estes vírus. Estes

dados, em conjunto com os resultados dos testes diagnóstico serão utilizados para um estudo da situação epidemiológica do Jardim Zoológico de Belo Horizonte em relação ao VLA e VDEH. Todos os testes diagnósticos sorológicos, moleculares e identificação dos *Culicoides* serão realizados no LPVA, enquanto os exames histopatológicos e IHQ serão efetuados no Laboratório de Histopatologia e Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária.

**1.12 Objetivos:** Estudo epidemiológico relacionado ao Vírus da Língua Azul (VLA) e o Vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica (VDEH) no Jardim Zoológico de Belo Horizonte.

**1.13 Materiais e métodos:** As amostras serão originárias de animais pertencentes ao Zoológico de Belo Horizonte. Serão recebidas amostras de animais vivos coletadas durante procedimentos de rotina realizados no Zoo e do banco de amostras do zoológico, que consistirão em sangue em EDTA, em heparina ou gel separador. Caso algum animal venha a óbito durante o período do estudo, com sinais sugestivos para VLA e VDEH será realizada a necrópsia e serão coletadas cerca de duas gramas de amostras de baço, pulmão, linfonodos, fígado, medula óssea vermelha e coração, além de sangue no coração. Caso ocorra algum aborto ou caso de animal natimorto será coletado, além das amostras já citadas. Uma porção das amostras oriundas da necropsia será refrigerado, encaminhado ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da UFMG (LPVA) e os resultados serão enviados imediatamente após a finalização dos testes. Outra parte da amostra será armazenada em formol para posteriores testes histopatológicos e de imuno-histoquímica. No caso dos animais que já morreram a mais tempo, as amostras que se encontram fixadas ou em lâmina serão utilizadas para fazer imuno-histoquímica. Caso a amostra se encontre em formol, ela será emblocada em parafina antes de ser processada para a realização IHQ. As amostras de sangue recebidas do zoológico serão centrifugadas e o soro ou plasma, dependendo do tipo de tubo utilizada, será separado e armazenado, nos tubos de EDTA parte das hemácias será separada para, caso a amostra seja positiva para qRT-PCR, realizar isolamento viral. O restante das hemácias será lavado e armazenado para caso seja necessário a realização do qRT-PCR. O soro ou plasma serão submetidos ao teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) para diagnóstico sorológico para VLA e/ou VDEH. Às amostras provenientes de necropsia serão submetidas a teste de qRT-PCR, Imuno-histoquímica e Histopatologia para verificar se este animal era positivo para VLA e/ou VDEH. Nos casos de animais positivos para os testes anteriores, será realizado o isolamento viral em células de inseto das amostras virêmicas e em seguida será realizado o sequenciamento para a identificação do sorotipo. Caso existam animais com sintomatologia clínica, amostras de sangue total e soro serão coletadas e será realizado um teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e qRT-PCR para diagnóstico de VLA e VDEH. Também serão realizados testes de Imuno-histoquímica e Histopatologia em amostras provenientes do Jardim Zoológico de Belo Horizonte, de ruminantes que morreram com suspeitas de doença hemorrágica, guardadas no Banco de Tecidos do setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG (World Organisation for Animal Health (OIE), 2019a; World Organisation for Animal Health (OIE), 2019b).

**1.14 Relevância:** A execução deste projeto permitirá o entendimento da epidemiologia do vírus da língua azul (VLA) e do vírus da doença epizoótica hemorrágica (VDEH) no Jardim Zoológico de Belo Horizonte, compreendendo melhor como se encontra a distribuição destas doenças, os animais afetados e assim permitindo a tomada de medidas corretas e eficientes para se lidar com tais doenças.

## **2 Equipe**

**Responsável:** Zelia Ines Portela Lobato

**CPF:** 52812359668

**Unidade:** Escola de Veterinária

**Departamento:** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

**Telefone:** 3132826897

**Celular:****Colaboradores**

2.2 Nome	2.1 CPF	2.3 Qualificação	2.4 Telefone	2.5 Email	2.6 Experiência (em anos)	2.7 Instituição de vinculação
Eduardo Alves Caixeta	10317861638	mestrado	3199977713	eduardoacaixeta@gmail.com	3	Universidade Federal de Minas Gerais
Graziele Cossenzo Florentino Galinari	04621177664	especialização	3197931240	grazzicos@gmail.com	10	Universidade Federal de Minas Gerais
Mariana Andrioli Pinheiro	06249748393	doutorado	8896940400	marianandrioli@gmail.com	5	Universidade Federal de Minas Gerais
Renato de Lima Santos	07152283826	pos-doutorado	3196863886	rsantosufmg@gmail.com	20	Universidade Federal de Minas Gerais

**3 Grupos de Experimentais**

3.1 Grupo	3.2 Nome vulgar	3.2.1 Outro	3.3 Quantidade	3.4 Raça ou linhagem	3.4.1 Raça ou linhagem (Inglês)	3.5 Sexo	3.6 Idade	3.7 Massa corporal	3.9 Invasividade
18078 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zootécnica 1	Espécie silvestre não-brasileira		2	órix	Oryx	indiferente	1 (anos)	1 kg	G11
3.8 Procedência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								

80725	órix - Oryx gazella								
3.12 Atividade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
18158 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 2	Espécie silvestre não-brasileira		2	cervo dama	European fallow deer	indiferente	1 (anos)	1 kg	G11
3.8 Procedência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	cervo dama - Dama dama								
3.12 Atividade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
18159 -	Espécie		2	cervo	red deer	indiferente	1 (anos)	1 kg	G11
Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 3	silvestre não-brasileira			nobre					
3.8 Procedência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	cervo nobre - Cervus elaphus								
3.12 Atividade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								

3.14	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
Local(is)									
18160 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 4	Espécie silvestre n ão- brasileira		2	Zebra	Plains Zebra	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	Zebra - Equus quagga								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
Local(is)									
18161 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 5	Espécie silvestre n ão- brasileira		2	Cobo- de- meia- lua	Waterbuc k	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	Cobo-de- meia-lua - Kobus elli psiprymnus								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
Local(is)									

18162 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 6	Espécie silvestre n ão- brasileira		2	rinoceront e branco	White Rhino	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	rinoceront e branco - Ceratother ium simum								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
18163 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 7	Espécie silvestre n ão- brasileira		2	camelo- doméstic o	dromedar y	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	camelo- doméstico - Camelus dromedari us								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								

18164 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 7	Espécie silvestre n ão- brasileira		2	camelo- doméstic o	dromedar y	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	camelo- doméstic o  - Camelus dromedar i  us								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
18165 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 8	Espécie silvestre n ão- brasileira		2	Lhama	llama	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	Lhama - Lama glama								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								

18166 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 9	Espécie silvestre brasileira		2	cervo do pantanal	Marsh Deer	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	cervo do pantanal - Blastocer u s dichoto mus								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
18167 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotâ nica 10	Espécie silvestre brasileira		2	veado catingueir o	Gray Brocket	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	veado catingueir o - Mazama g ouazoubir a								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								

18168 - Animais Da Fundação De	Espécie silvestre brasileira		2	anta	Lowland Tapir	indiferent e	1 (anos)	1 kg	GI1
Parques Municipais E Zoobotâ nica 11									
3.8 Proce dência	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								
3.11 N° SISBIO	3.13 Espécie								
80725	anta - Tapirus terrestris								
3.12 Ativi dade(s)	Coleta/transporte de amostras biológicas								
3.14 Local(is)	Jardim Zoológico de Belo Horizonte								

#### 4 Acomodações

**OBS. Ordem das dimensões: (Comprimento x Largura x Altura)**

4.1 Grupo de animal	4.2 Tipo de acomodaçã o	4.3 Local	4.3.1 Outro	4.4 Dimensões	4.5 Quantidade de animais	4.6 Tipo de cama	4.7 Exaustão do ar
18078 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 1	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	7	Não se aplica	Não
18158 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 2	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não

18159 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 3	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18160 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 4	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18161 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 5	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18162 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 6	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18163 - Animais Da Fundação De Parques	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não

Municipais E Zoobotânica 7							
18164 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 7	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18165 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 8	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18166 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 9	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não
18167 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não

Zoobotânica 10							
18168 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 11	Não se aplica	Outro	Jardim Zoológico de Belo Horizonte	7/7/7 m	2	Não se aplica	Não

## 5 Procedimentos

5.1 Grupo de animal	5.2 Procedimento
18078 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 1	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoletil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18158 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 2	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoletil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.

18159 - Animais Da Fundação De Parques Municipai s E Zoobotâ nica 3	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18160 - Animais Da Fundação De Parques Municipai s E Zoobotâ nica 4	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18161 - Animais Da Fundação De Parques Municipai s E Zoobotâ nica 5	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18162 - Animais Da Fundação De	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados

Parques Municipais E Zoobotânica 6	até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18163 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 7	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18164 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 7	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18165 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 8	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.

18166 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zootécnica 9	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoletil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18167 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zootécnica 10	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoletil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.
18168 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zootécnica 11	Coleta de amostras de sangue: As amostras dos animais vivos serão coletadas durante procedimentos de rotina, assim evitando estresse dos animais. Estas amostras consistirão em sangue em EDTA, em heparina, citrato ou gel separador. Os animais serão contidos quimicamente durante a coleta utilizando Zoletil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos estabelecidos pelos veterinários da FPMZB. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.

## 6 Planejamento Estatístico

**6.1 Especificação:** O projeto consiste em um estudo epidemiológico relacionado ao Vírus da Língua Azul (VLA) e o Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (VDEH) no Jardim Zoológico de Belo Horizonte, em que serão utilizadas amostras de sangue total e soro coletadas em procedimentos de rotina e provenientes do banco de amostras do Zoológico. Também serão utilizadas amostras de órgãos e outros tecidos da necrópsia de animais que vieram a óbito com sintomatologia característica para VLA e VDEH, assim como amostras de tecido provenientes do banco de tecidos do setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG. Com tais amostras será realizado teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), qRT-PCR, imuno-histoquímica (IHQ) e isolamento viral para VLA e

VDEH. Todas as amostras virão de animais com sintomatologia e que vierem ao óbito com forte suspeita de doenças hemorrágicas. Assim, o número de animais varia de acordo com o número de indivíduos que é acometido sazonalmente. Dessa forma não há como fazer uma previsão do número de animais que serão estudados. Os dados do RT-qPCR serão avaliados quanto aos valores de CT. A comparação das variáveis amostrais correlacionadas com o status sorológico para LA e DHE será realizada através do teste do qui-quadrado. Enquanto, os dados de distribuição anormal serão processados por métodos não paramétricos.

## **7 Local de Execução**

### **7.1 Local (unidade/laboratório):**

**7.1.1 Outro:** Jardim Zoológico de Belo Horizonte

**7.2 Descrição do local:** Ambientes em que os animais já são mantidos e estão de acordo com as normativas do Zoológico.

## **Manejo e Alimentação dos Animais**

### **7.3 Restrição alimentar:** Não se aplica

**7.3.1 Duração (em horas):**

**7.3.2 Justificativa:**

### **7.4 Restrição hídrica:** Não se aplica

**7.4.1 Duração (em horas):**

**7.4.2 Justificativa:**

### **7.5 Tipo de contenção:** Farmacológica

**7.5.1 Descrição da contenção:** Será utilizada contenção química durante os procedimentos de coleta utilizando Zoetil 3mg/kg junto com Xilazina 0,5mg/kg e os animais serão monitorados durante todo o procedimento, seguindo os protocolos já estabelecidos pelo Jardim Zoológico de Belo Horizonte.

## **8. Proc. Cirúrgicos e de Anestesia**

**8.1 Haverá algum tipo de procedimento cirúrgico?** Não se aplica

**8.1.2 Tipo:**

**8.1.3 Justifique o procedimento cirúrgico múltiplo ou repetitivo no mesmo animal:** **8.1.4 Informe de forma clara e objetiva o(s) procedimentos(s) cirúrgicos(s):**

**8.1.5.1 O animal deverá se recuperar da anestesia geral ao final da cirurgia?**

**8.1.5.2 Por quanto tempo o animal será mantido em experimentação após a cirurgia?**

**8.1.6.1 O experimento impedirá o animal de se alimentar de forma normal e espontânea?** **8.1.6.2 Justifique se o animal não puder se alimentar espontaneamente após a cirurgia:**

**8.1.7.1 Poderá ocorrer a perda temporária ou permanente de função do animal após a cirurgia?**

8.1.7.2 Justifique a possível ocorrência de perda temporária ou permanente de alguma função orgânica nos animais:

**8.2 Haverá indução de alterações metabólicas graves ou de processos degenerativos crônicos?** *Não se aplica*

8.2.2 Descreva o agente e os principais efeitos esperados:

**8.3 Haverá extração de fluidos orgânicos?** *Sim*

8.1.1 Informe a natureza do fluido, o local, o volume, a frequência e o método da colheita:

Será coletado, aproveitado o momento de avaliação clínica de rotina ou outros procedimentos rotineiros realizado nos animais sangue total em tubos com e sem anticoagulantes. Serão coletados até 8mL de sangue pela veia jugular utilizando o equipamento de coleta a vácuo (sistema vacuotainer) enroscando a agulha no canhão (adaptador) e retirando a capa protetora da agulha no momento da punção. Quando o animal estiver sedado será realizado antissepsia do local escolhido com algodão embebido com etanol à 70%. Posteriormente, será realizado o garrote da veia jugular, retirado a capa da agulha para introduzi-la no vaso, e depois, introduzir os tubos no adaptador. Por meio da pressão sanguínea, o sangue irá fluir para o tubo. Por fim, o local será limpo com etanol à 70%.

**8.4 O animal será usado apenas para retirada de órgãos?** *Não se aplica*

8.4.2 Informe sobre quais órgãos deverão ser retirados:

**8.5 No procedimento (cirúrgico ou não) serão utilizadas drogas pré-anestésicas ou anestésicas?** *Não se aplica*

8.1.2 Descreva a posologia, drogas e via de administração:

**8.6 No procedimento serão utilizadas drogas pré e/ou pós cirúrgicas (antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos, etc)?** *nao*

8.1.3 Descreva a posologia, drogas e via de administração ou justifique: *Não se aplica*

**9 Eutanásia**

9.1 Grupo de animal	9.2 Submissão a eutanásia?
18078 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 1	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18158 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 2	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18159 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 3	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte

18160 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 4	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18161 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 5	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18162 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 6	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18163 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 7	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18164 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 7	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18165 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 8	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18166 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 9	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
18167 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 10	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte
<hr/>	
18168 - Animais Da Fundação De Parques Municipais E Zoobotânica 11	Não
9.3 Destino dos animais não submetidos à eutanásia	Jardim Zoológico de Belo Horizonte

## **10 Biossegurança**

**10.1.1 O local é constantemente supervisionado e de fácil acesso, de modo a atender de modo rápido as situações emergenciais, mesmo em fins de semana, feriados e recessos institucionais? *Sim***

**10.1.2** INFORME a descrição de como é a supervisão do local e procedimentos em caso de situação de emergência: Além dos tratadores de animais, biólogos e veterinários, que trabalham diariamente, de 7:00 as 17:00, existem vigias em toda a área do Jardim Zoológico de Belo Horizonte 24 horas por dia.

**10.2.2** **Existem equipamentos para detecção de incêndio ou vazamentos de gás, inundações e situações similares, em períodos que dispensam a presença de pessoas?**  
*Não*

**10.2.1** INFORME sobre equipamentos para detecção de incêndio ou vazamentos de gás, inundações e situações similares, em períodos que dispensam a presença de pessoas: Além dos tratadores de animais, biólogos e veterinários, que trabalham diariamente, de 7:00 as 17:00, existem vigias em toda a área do Jardim Zoológico de Belo Horizonte 24 horas por dia.

**10.3.1** **São fixados avisos sobre medidas e procedimentos de biossegurança no local onde se encontram os animais e de como se proceder nos casos de incêndio ou vazamentos de gás, inundações e situações similares, em locais com animais inoculados com germes ou substâncias radioativas que podem contaminar perigosamente outros animais e pessoas?** *Não*

**10.3.2** INFORME como serão os avisos e procedimentos de biossegurança: Jardim Zoológico de Belo Horizonte não possui esse tipo de procedimentos de biossegurança.

**10.4.1** **Haverá administração/inoculação de toxinas, microorganismos, parasitas, agentes químicos tóxicos, células tumorais, exposição a outros agentes considerados perigosos para outros animais, pessoas ou meio ambiente?** *Não*

**10.4.2** INFORME como será a administração/inoculação: Não se aplica.

**10.5** Quais são os procedimentos de limpeza?: No interior dos recintos a limpeza é feita diariamente pelos tratadores de animais. Os resíduos são coletados diariamente e encaminhados à SLU. A gerência de veterinária possui um serviço terceirizado de coleta e destinação de resíduos biológicos e químicos.

**10.6** **Como será o acondicionamento, tratamento (se necessário, antes do destino final) e o destino final dos dejetos e das carcaças dos animais após a eutanásia?** *Não se aplica.*

**10.7** Material radioativo: Não se aplica.

**10.8** Nº. do registro de manejo de radioativos: Não se aplica.

## **11 Documentos (Anexos)**

**11.1** **Cópias de dois artigos científicos recentemente publicados nos quais foram utilizados procedimentos similares aos propostos:**

- ♦ Epizootic Hemorrhagic Disease in Brocket Deer, Brazil-
- ♦ compactado.pdf Multiple bluetongue virus.pdf

**11.2 Outros Anexos:**

- chapitre\_bluetongue.pdf
- chapitre\_ehd.pdf

**12 Termo de Responsabilidade**

Eu, **Zelia Ines Portela Lobato** certifico que:

- a)** li e acato o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b)** este estudo não é duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c)** não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto;
- d)** o projeto terá início apenas após a aprovação da CEUA;
- e)** todas as informações preenchidas são verdadeiras.

**8.3. Anexo 3: Carta de Anuência da FPMZB-BH.**PARQUES E  
ZOOBOTÂNICAPREFEITURA  
BELO HORIZONTE**DECLARAÇÃO**

A Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte informa estar ciente e concordar com a realização do projeto de pesquisa “*Estudo do vírus da língua azul (VLA) e vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH) em ruminantes do Jardim Zoológico de Belo Horizonte*”, no período de 13/12/2021 a 13/12/2022 de responsabilidade do pesquisador Eduardo Alves Caixeta.

Belo Horizonte, 09 de Dezembro de 2021

SERGIO AUGUSTO DOMINGUES:99046520668 Assinado de forma digital por SERGIO AUGUSTO DOMINGUES:99046520668 Dados: 2021.12.10 15:57:18

**Sérgio Augusto Domingues Presidente**

Fundação de Parques Municipais e  
Zoobotânica

## 8.4. Anexo 4: Laudo Anatomopatológico 20/00337.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 ESCOLA DE VETERINÁRIA  
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS  
 SETOR DE PATOLOGIA



## Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 20/00337	Ficha Clínica Nº
Espécie: Veado catigueiro ( <i>Mazama gouazoubira</i> )	Data de Recebimento: 02/04/2020
Nome do Animal:	Data do Óbito: 02/04/2020
Raça:	Data da Necropsia: 02/04/2020
Sexo: Fêmea	Proprietário: Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte
Idade: dias	Tel./Fax: ( ) -
Peso: Kg	Procedência: Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte
Veterinário Responsável:	
Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3409-2239	

Exame Solicitado:  Necropsia  Histopatológico  Toxicológico  Bacteriológico  
 Viroológico  Parasitológico  Outros:

Material Enviado:  Material Fresco -  Carcaça  Órgãos:  
 Material Fixado:

## Histórico:

Animal encontrado morto no recinto.

## Achados Macroscópicos:

Pele da região nasal intensamente avermelhada (hiperemia) com quantidade moderada de líquido esbranquiçado espumoso nas narinas (edema).  
 Mucosas oral e vaginal moderadamente cianóticas.  
 Língua difusamente vermelho escura com duas áreas focais de 0,5 e 0,3 cm de diâmetro de perda de continuidade do epitélio de revestimento (úlceras).  
 Subcutâneo da região abdominal lateral com duas áreas focalmente extensas simétricas de hemorragia.  
 Saco pericárdico com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia no pericárdio e no endocárdio. Ápice com área focalmente extensa esbranquiçada associada a múltiplas áreas de hemorragia.  
 Coração com áreas multifocais de hemorragia no pericárdio e no endocárdio. Ápice com área focalmente extensa esbranquiçada associada a múltiplas áreas de hemorragia.  
 Pulmões não colapsado, de superfície lisa e brilhante com evidência dos septos interlobulares. Ao corte, com moderada quantidade de líquido esbranquiçado espumoso até o terço médio da traqueia (edema).  
 Omento com múltiplas áreas coalescentes de hemorragia.  
 Intestino delgado com conteúdo pastoso e vermelho escuro (hemorragia).  
 Corno uterino direito intensamente dilatado contendo um feto aproximadamente no terço médio da gestação.  
 Pele do feto com múltiplas áreas de hemorragia (petéquias), principalmente da região da cabeça.

## Histopatologia:

Fêmea:  
 Encéfalo: vasos da meninge e do córtex com marginação leucocitária, hipertrofia do endotélio e alguns com infiltrado linfocítico e alguns neutrófilos na parede e no espaço perivascular. Hemorragia perivascular discreta. Córtex com áreas multifocais de gliose discreta.

Língua: área focalmente extensa de perda de continuidade do epitélio associada a deposição de material eosinofílico amorfo (necrose), material finamente granular basofílico (colônias bacterianas), e material fibrilar eosinofílico arranjado em formato cilíndrico (trombos de fibrina). Hemorragia subepitelial multifocal moderada associada a dilatação do vasos (congestão). Vasos abaixo da área de necrose superficial intensamente dilatados e parcialmente obstruídos por material fibrilar eosinofílico (trombo de fibrina). Miócitos adjacentes ao vaso e a áreas de necrose do epitélio intensamente eosinofílicos e por vezes fragmentados (necrose de coagulação) entremeados por infiltrado inflamatório moderado formado por histiócitos e neutrófilos associado a hemorragia e inúmeras estruturas basofílicas bacilares (bacilos de putrefação).

Esôfago: submucosa com áreas multifocais discretas de infiltrado linfocítico predominantemente perivascular e hemorragia multifocal discreta. Epitélio da mucosa com hiperplasia paracéptica moderada.

Rúmen: lâmina própria com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia intensa associada a infiltrado neutrofilo. Algumas papilas com necrose de coagulação da metade superficial da papila, associada a hemorragia e, por vezes, vaso ocluído por material eosinofílico fibrilar (trombo).

Reticulo: lâmina própria e submucosa com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia intensa.

Omaso: lâmina própria com áreas multifocais discretas de hemorragia e alguns macrófagos com hemácias

Prof. Renato de Lima Santos  
 CRMV-MG 4.577  
 EM-UFMG

intracitoplasmáticas (eritrofagocitose).

Abomaso: congestão moderada.

Intestino delgado: tecido adiposo adjacente com áreas multifocais de hemorragia moderada.

Intestino grosso: lâmina própria e submucosa com áreas multifocais de hemorragia moderada e infiltrado neutrofílico discreto. Vasos sanguíneos com hipertrofia de células endoteliais dos vasos sanguíneos. Algumas áreas com necrose do topo das vilosidades associada a hemorragia. Vasos sanguíneos da serosa com hipertrofia do endotélio e infiltrado linfo-histiocitário (vasculite).

Linfonodos: seios medulares com moderada quantidade de macrófagos e hemácias. Áreas multifocais discreta de infiltrado neutrofílico. Vasos sanguíneos com hipertrofia do endotélio. Tecido adiposo adjacente com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia.

Coração: epicárdio com áreas multifocais extensas de hemorragia. Miocárdio com áreas multifocais discretas de hemorragia e área focalmente extensa de necrose de cardiomiócitos (necrose de coagulação). Vasos moderadamente dilatados e repletos de hemácias (congestão).

Traqueia: sem alterações histológicas significativas.

Tireoide: tecido conjuntivo adjacente com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia moderada.

Pulmão: áreas multifocais de espessamento moderado dos septos com infiltrado linfo-histiocitário. Lúmen dos alvéolos com áreas de acúmulo de moderada quantidade de material eosinofílico homogêneos (edema), outras áreas com acúmulo de hemácias (hemorragia) ou acúmulo de material eosinofílico fibrilar (fibrina), por vezes revestindo a superfície do espaço alveolar (membrana hialina). Vasos sanguíneos dilatados e repletos de hemácias (congestão discreta). Áreas multifocais com discreta quantidade de macrófagos com pigmento enegrecido intracitoplasmático (antracose).

Fígado: espaços porta com infiltrado inflamatório discreto formado por linfócitos e macrófagos com raros neutrófilos. Alguns espaços porta com hemorragia discreta. Células de Kupfer e alguns aglomerados de macrófagos com pigmento intracitoplasmático acastanhado (interpretado como hemossiderina). Vasos sanguíneos dilatados e repletos de hemácias (congestão discreta).

Baço: polpa vermelha com material fracamente eosinofílico homogêneo formando feixes (fibrina). Polpa branca com hemorragia moderada.

Adrenal: medular com hemorragia difusa intensa. Cortical com áreas multifocais de hemorragia discreta. Células da medular com núcleos grandes em sua maioria vacuolizados. Tecido conjuntivo adjacente com áreas multifocais extensas de hemorragia intensa.

Rim: alguns túbulos com células de citoplasma eosinofílico e núcleos fragmentados (necrose tubular aguda). Área focal de hemorragia discreta. Alguns vasos com hipertrofia do endotélio associada a infiltrado linfo-histiocitário (vasculite).

Bexiga: epitélio e submucosa com áreas multifocais de hemorragia discreta.

Útero: endométrio e miométrio com áreas multifocais de infiltrado linfo-histiocitário predominantemente perivascular associado a hemorragia discreta. Alguns vasos com hipertrofia do endotélio e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário (vasculite). Placentoma com áreas multifocais de congestão e hemorragia, por vezes com material eosinofílico parcialmente obstruindo o lúmen dos capilares (trombo de fibrina) e áreas multifocais de infiltrado linfo-histiocitário discreto.

Ovário: áreas multifocais de hemorragia discreta.

Músculo: sem alterações histológicas significativas.

Glândula mamária: interstício com infiltrado linfocítico difuso discreto.

Feto:

Pele: derme superficial e músculo subcutâneo com áreas multifocais de hemorragia intensa.

Rim: cortical com áreas multifocais de hemorragia moderada. Autólise moderada.

Fígado: vasos dilatados e repletos de hemácias (congestão moderada).

Coração: vasos dilatados e repletos de hemácias (congestão discreta).

Pulmão: áreas multifocais de hemorragia moderada.

Timo, baço e testículo: sem alterações histológicas significativas.

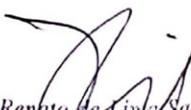
Encéfalo: vasos dilatados e repletos de hemácias (congestão discreta).

#### DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS:

Fêmea:

Encéfalo: meningoencefalite não supurada multifocal moderada com vasculite e hemorragia.

Língua: glossite necro-hemorrágica ulcerativa histiocítica e neutrofílica com trombose.

  
Prof. Renato de Lima Santos  
CRMV-MG 4.577  
EV-UFMG

Esôfago: esofagite linfo-histiocitária multifocal discreta com hemorragia discreta.  
 Rúmen: ruminite necro-hemorrágica e neutrofilica multifocal intensa com trombose multifocal.  
 Reticulo: hemorragia multifocal intensa.  
 Omaso: hemorragia multifocal discreta.  
 Abomaso: congestão moderada.  
 Intestino delgado, serosa: hemorragia multifocal moderada.  
 Intestino grosso: hemorragia multifocal moderada com vasculite linfo-histiocitária.  
 Linfonodos: linfadenite neutrofilica multifocal discreta com histiocitose e hemorragia moderadas.  
 Coração, epicárdio e miocárdio: hemorragia multifocal moderada e necrose focalmente extensa.  
 Pulmão: pneumonia intersticial linfo-histiocitária multifocal moderada com edema, hemorragia e membrana hialina intralveolares.  
 Fígado: hepatite portal linfocitária discreta com hemorragia discreta.  
 Baço: esplenite fibrino-hemorrágica difusa moderada.  
 Adrenal: hemorragia multifocal intensa.  
 Rim: necrose tubular multifocal discreta com hemorragia focal discreta e vasculite linfo-histiocitária discreta.  
 Bexiga: hemorragia multifocal discreta.  
 Útero: metrite linfo-histiocitária multifocal moderada com hemorragia e vasculite linfo-histiocitária.  
 Ovário: hemorragia multifocal discreta.  
 Glândula mamária: mastite linfocitária difusa discreta.  
 Feto:  
 Pele: hemorragia multifocal intensa.  
 Rim: hemorragia multifocal moderada.  
 Fígado: congestão moderada.  
 Coração: congestão discreta.  
 Pulmão: hemorragia multifocal moderada.  
 Encéfalo: congestão discreta.

#### Exames Complementares:

PCR – Vírus da doença hemorrágica epizootica: positivo nas amostras de fígado e rim, negativo na amostra de placenta.  
 PCR – Vírus da língua azul: negativo nas amostras de fígado, rim e placenta.

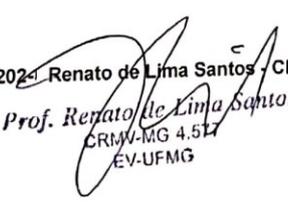
#### Conclusão:

Doença hemorrágica sistêmica compatível com a infecção pelo vírus da doença hemorrágica epizootica.

#### Comentários:

As lesões hemorrágicas observadas nos vários órgãos avaliados associadas as lesões vasculares (hipertrofia endotelial e vasculite) são compatíveis com a infecção pelo vírus da doença hemorrágica epizootica, confirmada por meio de PCR. As lesões necrotizantes são atribuíveis à injúria vascular primária e trombose. Outras alterações, como a meningoencefalite observada nesse animal, não são clássicas da infecção por esse vírus e devem ser investigadas. Trata-se de uma doença que pode causar surtos em cervídeos ou casos esporádicos em ambientes endêmicos.

Belo Horizonte, 18/06/2024. Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3409-2239

  
 Prof. Renato de Lima Santos  
 CRMV-MG 4.517  
 EV-UFMG

## 8.5. Anexo 5: Sequências do Seg-2 da amostra Zoo utilizada para a sorotipagem.

>Zoo Forward

```

CGGTGGAGAGTAATGGGATTATATCATCAGAAGATGCGTTCGAGGAATTAATACGTAGCT
CAAGCGCAAATGTGAAGTTAAAACTGATTTTAGCGGTGACCGCATACATCATGAAGTAT
CATATTGCGATATCCATACTGATGCAACGATAGCGGAACTATTGAGATTGACGCGCATA
ATAACGAAGAAGAAGGTTGTTCCACGGTGAAAATACGGTAGTATATAATCATTTATTAA
CAGAGTCGAATTACATAGGGTCGGGGACGTGTTACGATTTGGAGGATCATATACAGCTGA
  
```

>Zoo Reverse

```

AGGATCATATACAGCTGAGAACAATAGGAGACGTTGGTCCGCGACCTCGCGATCATATTG
ATGTATTAGGGCGGACACATTCTAGAGGAGAGAAGCAAATAATTCGGAGATACGGAGGCG
GTGAGATTAACGCTAACCACCAGTGTGAGCCCAGACGAATTTGAACTTAAAAAGAAAA
TATTTAATGGGGACGTGGCAATTGGAGTAGAGAAAAGAGATTTAATTAATATAGTGATG
AGATACTACAATTAGATGATATTGCGGCGAGTTGGATTAGGACCCAGAACGCGAATAACT
TGGAGAAGATCGTTGCGTTATTGGAGCAGCTGGGAGAAAAGAAACAAAAGGTAGAGCCGT
ATAACTCAAATGACATACGTGAACGTTTCAGAAAAA
  
```

Blast Zoo Forward

The screenshot displays the NIH BLAST search results for the query XNZC2Y8H013. The search parameters are as follows:

- Job Title: Zoo Forward
- RID: XNZC2Y8H013
- Program: BLASTN
- Database: nt
- Query ID: Icl|Query\_20225
- Description: Zoo Forward
- Molecule type: dna
- Query Length: 300

The filter results section shows the following settings:

- Organism: Type common name, binomial, taxid or group name
- Percent Identity: [ ] to [ ]
- E value: [ ] to [ ]
- Query Coverage: [ ] to [ ]

The table below shows the sequences producing significant alignments:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Epizootic hemorrhagic disease virus isolate EHD2/USA1975/ID/76-5460-M-32313-75 VP2 protein (VP2) gene, complete cds	Epizootic hemorr...	390	390	100%	6e-104	90.10%	3002	KU140737.1
Epizootic hemorrhagic disease virus isolate EHD2/USA1971/MI/SS-45-DEER-137 VP2 protein (VP2) gene, complete cds	Epizootic hemorr...	385	385	100%	3e-102	89.77%	3002	KU140738.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 600044, complete sequence	Epizootic hemorr...	385	385	100%	3e-102	89.77%	3003	L33829.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 600042, complete sequence	Epizootic hemorr...	385	385	100%	3e-102	89.77%	3002	L33824.1
Epizootic hemorrhagic disease virus isolate CC 129-00 VP2 protein gene, complete cds	Epizootic hemorr...	379	379	100%	1e-100	89.44%	3002	HM536898.1
Epizootic hemorrhagic disease virus (serotype 2 / strain Alberta) segment 2	Epizootic hemorr...	379	379	100%	1e-100	89.44%	3002	AM744998.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 600045, complete sequence	Epizootic hemorr...	379	379	100%	1e-100	89.44%	3002	L33829.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 600041, complete sequence	Epizootic hemorr...	379	379	100%	1e-100	89.44%	3002	L33823.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 600038, complete sequence	Epizootic hemorr...	379	379	100%	1e-100	89.44%	3002	L33822.1
Epizootic hemorrhagic disease virus isolate EHD2/USA1991/WY/CC211-91 VP2 protein (VP2) gene, complete cds	Epizootic hemorr...	374	374	100%	9e-99	89.11%	3002	KU140735.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 600036, complete sequence	Epizootic hemorr...	374	374	100%	9e-99	89.11%	3002	L33821.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate SV 124, complete sequence	Epizootic hemorr...	374	374	100%	9e-99	89.18%	3002	L33818.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate USA2016/GA segment 2, complete sequence	Epizootic hemorr...	368	368	100%	3e-97	88.78%	2949	MN824458.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate CC12-463 viral protein 2 gene, complete cds	Epizootic hemorr...	368	368	100%	3e-97	88.78%	2949	MH347400.1
Epizootic hemorrhagic disease virus 2 isolate CC12-283 viral protein 2 gene, complete cds	Epizootic hemorr...	368	368	100%	3e-97	88.78%	2949	MH347382.1

Blast Zoo Reverse

National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information
[Log in](#)

BLAST® » blastn suite » results for RID-XNZGY3TS013
Home Recent Results Saved Strategies Help

**Join the BLAST testing community**  
Be a part of group testing exciting new BLAST products and features

[Join](#)

[< Edit Search](#)
[Save Search](#)
[Search Summary](#)
[How to read this report?](#)
[BLAST Help Videos](#)
[Back to Traditional Results Page](#)

**Job Title** Zoo Reverse

**RID** [XNZGY3TS013](#) Search expires on 02-03 07:04 am [Download All](#)

**Program** BLASTN [Citation](#)

**Database** nt [See details](#)

**Query ID** Icl|Query\_43237

**Description** Zoo Reverse

**Molecule type** dna

**Query Length** 395

**Other reports** [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

**Filter Results**

**Organism** only top 20 will appear  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

---

**Percent Identity**  to

**E value**  to

**Query Coverage**  to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions
Graphic Summary
Alignments
Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** Download Select columns Show 100

select all 71 sequences selected

GenBank
Graphics
Distance tree of results
MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 800038, complete sequence</a>	Enzootic hemorr...	475	475	99%	2e-129	88.55%	3002	<a href="#">L33821.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 800042, complete sequence</a>	Enzootic hemorr...	468	468	98%	4e-127	88.27%	3002	<a href="#">L33824.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate WDL 12-288 viral protein 2 gene, complete cds</a>	Enzootic hemorr...	462	462	98%	2e-125	88.01%	2949	<a href="#">MH347412.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus isolate EHD2/USA1975/D/78-5480-M-32313-75 VP2 protein (VP2) gene, complete cds</a>	Enzootic hemorr...	462	462	98%	2e-125	88.01%	3002	<a href="#">KU140737.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus (serotype 2 / strain Alberta) segment 2</a>	Enzootic hemorr...	462	462	98%	2e-125	88.01%	3002	<a href="#">AM744998.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate SV 124, complete sequence</a>	Enzootic hemorr...	462	462	98%	2e-125	88.01%	3002	<a href="#">L33818.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus isolate EHD2/USA1971/M/ISS-95-DEER-137 VP2 protein (VP2) gene, complete cds</a>	Enzootic hemorr...	457	457	98%	8e-124	87.76%	3002	<a href="#">KU140738.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus isolate EHD2/USA1993/AL/CC110-93 VP2 protein (VP2) gene, complete cds</a>	Enzootic hemorr...	457	457	98%	8e-124	87.76%	3002	<a href="#">KU140734.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 800045, complete sequence</a>	Enzootic hemorr...	457	457	98%	8e-124	87.76%	3002	<a href="#">L33826.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 800041, complete sequence</a>	Enzootic hemorr...	457	457	98%	8e-124	87.76%	3002	<a href="#">L33823.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus isolate 1993_AL_VP2 mRNA, partial cds</a>	Enzootic hemorr...	457	457	98%	8e-124	87.76%	681	<a href="#">AY714687.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate IL42218 VP2 protein gene, complete cds</a>	Enzootic hemorr...	451	451	98%	4e-122	87.53%	2986	<a href="#">MK754250.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate 800044, complete sequence</a>	Enzootic hemorr...	451	451	98%	4e-122	87.50%	3003	<a href="#">L33825.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus isolate 1994_NC-C_VP2 mRNA, partial cds</a>	Enzootic hemorr...	451	451	98%	4e-122	87.50%	681	<a href="#">AY714693.1</a>
<a href="#">Enzootic hemorrhagic disease virus 2 isolate CC12-390 viral protein 2 gene, complete cds</a>	Enzootic hemorr...	446	446	98%	2e-120	87.28%	2949	<a href="#">MH347394.1</a>