

**MARIA HELENA MAZZONI BALDINI**

**PESQUISA DE DOENÇAS HEMORRÁGICAS EM  
CERVÍDEOS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA  
DA ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU – PR**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**LAGES -SC  
2016**

Baldini, Maria Helena Mazzoni

Pesquisa de doenças hemorrágicas em cervídeos  
do Refúgio biológico Bela Vista da Itaipu  
Binacional, Foz do Iguaçu-PR / Maria Helena Mazzoni  
Baldini - Lages, 2016.

81 p.: il.; 21 cm

Orientador: Aury Nunes de Moraes

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade do  
Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Cervídeos. 2. Orbiviroses. 3. Adenovirus. I.  
Baldini, Maria Helena Mazzoni. II. Moraes, Aury  
Nunes de. III. Universidade do Estado de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal. IV. Título

**MARIA HELENA MAZZONI BALDNI**

**PESQUISA DE DOENÇAS HEMORRÁGICAS EM  
CERVÍDEOS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA  
DA ITAIPU BINACIONAL, FOZ DO IGUAÇU – PR**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

**Banca examinadora:**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes**  
Universidade do Estado de Santa Catarina

**Membro:**

**Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa**  
Universidade do Estado de Santa Catarina

**Membro:**

**Dra. Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas**

A todos aqueles capazes de  
compreender a complexidade de uma  
vida, e de dar-lhe o devido valor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo o apoio que me deram em relação aos meus estudos, por sempre me incentivar em perseguir meus objetivos, e pela paciência em me escutar e entender meus interesses. Agradeço também a toda minha família, pela ajuda e incentivo.

Ao meu professor orientador, Dr. Aury Nunes de Moraes pelo auxílio na realização do projeto. A todos do Grupo de Pesquisa de Anestesiologia Veterinária pelos ensinamentos, pela ajuda e compreensão, pois mesmo que minha linha de pesquisa divergisse da área de anestesiologia, sempre se prontificaram em me ajudar no que fosse necessário.

Aos meus amigos, em especial os meus colegas de turma, pelas as conversas o apoio que me incentivavam a seguir em frente, pois mesmo que não estejamos mais perto uns dos outros, sei que mesmo longe, eles ainda estão comigo quando eu precisar.

À Itaipu Binacional, pela oportunidade e ajuda na realização do projeto. À equipe do Refúgio Biológico Bela Vista, em especial ao veterinário Zalmir Silvino Cubas, por sempre estar disposto a ajudar e por incentivar a realização desse projeto. Agradeço também à companhia e dedicação dos veterinários, biólogos, tratadores, estagiários e funcionários do Hospital Veterinário e do Laboratório Ambiental da Itaipu especialmente ao Wanderlei de Moraes, Marcos José de Oliveira, Rosane Braun, Morgana Boldrini e Stacy Wu. Agradeço também ao Daniel Felippi, bolsista de iniciação científica que foi de grande ajuda durante a realização do projeto.

À Prof, Dr. Zélia Lobato da UFMG, ao Dr. Júlio César e sua equipe por todo o auxílio, disponibilidade e paciência em me ensinar e responder a todas minhas dúvidas.

Agradeço também a todos meus animais de estimação, os que estão aqui e os que já se foram, pois por mais abstrato que

pareça, suas companhias têm me ajudado a manter a alegria de viver, mesmo quando a vida fica difícil, e também por me ensinarem, desde muito pequena, a aceitar a vida e a morte, a alegria e a saudade e por me ensinarem que toda a vida tem o mesmo valor e, independentemente da espécie, do tamanho e da aparência, a vida deve ser respeitada.

Agradeço a todos os que trabalham em prol da conservação, pois a devoção a essa causa é das mais contagiantes.

Agradeço a todos que participaram desse projeto, de uma forma ou outra, pois com esse trabalho fui capaz de compreender que quando se trabalha sozinho, nossa capacidade fica restrita, e que só rompendo as barreiras entre instituições, profissões e áreas de pesquisa é que conseguiremos cumprir o verdadeiro objetivo da ciência, o de identificar os problemas e achar as soluções.

Jeremy Bentham

“Não importa se eles são incapazes  
ou não de pensar. O que importa é  
que são capazes de sofrer”.

## RESUMO

Os cervídeos neotropicais são pouco estudados, particularmente as espécies pertencentes ao gênero *Mazama*, em razão da dificuldade de acesso aos animais silvestres e suas amostras. O *status* de conservação da espécie *Mazama nana* não está bem definido. As principais ameaças a esses animais são a caça ilegal, a destruição de seu habitat e a proximidade a animais domésticos, que podem introduzir doenças comuns em populações de ruminantes silvestres. Dentre as doenças importantes em cervídeos, as síndromes hemorrágicas são muito frequentes e levam a um alto índice de morbidade e mortalidade. As doenças que provocam sinais e quadro de hemorragia generalizada em cervídeos são conhecidas pelo nome genérico de doenças hemorrágicas, e são três os agentes virais reconhecidos atualmente: um adenovírus (vírus da doença hemorrágica por adenovírus) e dois orbivirus, (o vírus da língua azul BTV e o vírus da doença epizoótica hemorrágica EHDV). O Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional vem reproduzindo com sucesso a espécie *Mazama nana* desde 1990, conhecida popularmente como veado-bororó-do-sul, porém, fazendo uma revisão histórica, percebe-se que desde que a criação foi iniciada, ocorreram mortes de cervídeos com sinais compatíveis com as doenças hemorrágicas. Entretanto, o agente etiológico nunca foi identificado. O presente projeto teve por objetivo identificar o agente viral que tem causado a doença hemorrágica no plantel de veados-bororó-do-sul do Refúgio Biológico Bela Vista, situado no município de Foz do Iguaçu, Paraná. Foram avaliadas amostras obtidas por meio de

necropsia, incluindo fragmentos de fígado, coração, linfonodos e esôfago, além de amostras de sangue de 32 animais vivos para a pesquisa de material genético viral pelo teste de RT-PCR em tempo real para o vírus da língua azul e semi-nested RT-PCR para o vírus da doença epizoótica hemorrágica, além de PCR convencional para o adenovírus de cervídeos. A técnica de IDGA foi utilizada para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da língua azul. Quatro amostras, provenientes de animais que vieram a óbito com sinais de doença hemorrágica, foram positivas para o teste de RTq-PCR contra língua azul (BTV), e a partir desse material foi possível isolar e sorotipificar o vírus. Ao final do estudo, foram identificados três sorotipos até então desconhecidos em território brasileiro, o BTV3, BTV14 e BTV18. A prevalência de animais soropositivos para BTV foi de 3,12%. Todos os testes de semi-nested RT-PCR para o vírus da doença epizoótica hemorrágica (EHDV) e de PCR convencional para adenovírus tiveram resultados negativos. Com este estudo foi possível determinar que o BTV é o agente causador da doença hemorrágica no plantel de veados-bororós-do-sul do Refúgio Biológico Bela Vista e que pelo menos três sorotipos estão envolvidos na epidemiologia da doença.

**Palavras chave:** cervídeos; orbiviroses; adenovírus; testes moleculares.

## **ABSTRACT**

Neotropical deer are poorly studied species, particularly those belonging to the genus *Mazama* because of the access difficulty to these animals. The conservation status of *Mazama nana* is not well known and their main threats are poaching, habitat destruction and exposure to domestic animal diseases. Among the important diseases in cervids, haemorrhagic syndromes are very common and lead to a high rate of morbidity and mortality. Diseases leading to signs of widespread bleeding are known as haemorrhagic diseases and in deer, there are three causative viral agents currently recognized: an adenovirus (Adenoviral haemorrhagic disease virus) and two orbiviruses (Bluetongue disease virus, BTV, and Epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV). The Bela Vista Biological Refuge of Itaipu Binacional has been successfully reproducing the species *Mazama nana*, popularly known as the brazilian dwarf brocket deer, since 1990. While the death of animals with compatible signs with bleeding disorders has been occurring ever since, the etiological agent has not yet been identified. Thus, this project aimed to identify the viral agent that has been causing haemorrhagic disease in the herd of Brazilian dwarf brocket deer from the Bela Vista Biological Refuge. Therefore, we evaluated autopsy samples, including liver, heart, lymph nodes and esophagus as well blood from 32 live animals in the search for viral genetic material, using namely the RT-PCR test for BTV, semi-nested RT-PCR for EHDV and the conventional PCR for adenovirus. In addition, we applied the Agar Gel Immunodiffusion technique (AGID) for detecting antibodies against BTV. Four samples, belonging from animals that died with haemorrhagic disease signs, were positive for RT-PCR test against BTV, and from this material, it was possible to isolate and serotype the virus. At the end of the study, we identified three serotypes thus far unknown in Brazil, the

BTV3, BTV14 and BTV18 plus a serotype not yet identified. The prevalence of seropositive animals to BTV was 3.12%. All semi-nested RT-PCR tests for EHDV and conventional PCR for AHDV had negative results. Therefore, we concluded that the BTV is the causative agent of the haemorrhagic disease of the brazilian dwarf brocket deers from the Bela Vista Biological Refuge and at least three serotypes are involved in the epidemiology of the disease

**Keywords:** deer; Oorbivirus; adenovirus; molecular tests.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1- Exemplar macho de <i>Mazama nana</i> , sob efeito da contenção química para colheita de sangue e exame físico .....	37
Figura 2- Animal identificado como CASIB 2534 apresentando edema sublingual e baixo nível de consciência.....	39
Figura 3- CASIB 2534 apresentando sangue em região perianal <i>momentos antes do óbito</i> .....	40
Figura 4- Trato gastrointestinal do animal CASIB 2534 apresentando segmentos hemorrágicos.....	50
Figura 5- Área de sufusão em miocárdio do animal CASIB 2534.....	50
Figura 6- Imagem do gráfico gerado pelo <i>software</i> mostrando as curvas de dissociação das amostras de sangue e tecido provenientes do animal identificado como CASIB2534.....	51
Figura 7- Imagem do Gráfico gerado pelo software mostrando a curva de dissociação no teste de RTq-PCR das amostras de tecido provenientes dos animais identificados como CASIB 2433 e CASIB 2583.....	52

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Primers utilizados nos testes de identificação viral.....	45
Tabela 2 - Alterações macroscópicas em necropsias de veados-bororós positivos para BTV no teste de RTq-PCR.....	46

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Dados obtidos na anamnese dos exemplares de <i>Mazama nana</i> do Refúgio Biológico Bela Vista (RBBV), durante a contenção química .....	72
Quadro 2 – Parâmetros fisiológicos obtidos durante o exame físico dos exemplares de <i>Mazama nana</i> submetidos à contenção química com cetamina (7 mg/kg) e detomidina (100 mg/kg) para a colheita de amostras de sangue.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anticorpos fluorescentes
AHS	Doença equina africana
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney cells</i> (células renais de filhotes de hamster)
BTV	<i>Blue tongue virus</i> (vírus da língua azul)
CASIB	Criadouro de Animais Selvagens da Itaipu Binacional
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DD	<i>Data deficient</i> (dados insuficientes)
DEH	Doença epizoótica hemorrágica
EHDV	<i>Epizootic haemorrhagic disease virus</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (teste de ELISA)
FC	Fixação do complemento
IDGA	Imunodifusão em ágar gel
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
IFA	Imunofluorescência indireta
LA	Língua azul
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
OIE	<i>Offices International Des Epizooties</i>
OdAdV-1	<i>Odocoileus hemionius</i> vírus
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PAN CERVIDEOS	Plano Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção
RBBV	Refúgio Biológico Bela Vista
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
VU	Vulnerável

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	24
2.1	O VEADO-DE-MÃO-CURTA ( <i>Mazama nana</i> ).....	24
2.2	LÍNGUA AZUL.....	25
2.3	DOENÇA EPIZOÓTICA HEMORRÁGICA.....	29
2.4	DOENÇA HEMORRÁGICA POR ADENOVIRUS.....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	35
4.1	CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS.....	35
4.1.1	Animais do CASIB.....	35
4.1.2	Animais do Zoológico.....	37
4.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ENVIO AO LABORATÓRIO.....	38
4.2.1	Separação do soro.....	38
4.2.2	Lavado de hemácias.....	38
4.3	COLHEITA E SEPARAÇÃO DO MATERIAL DE NECRÓPSIA.....	40
4.4	IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE.....	41
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	42
4.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEMI NESTED PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (SEMI-NESTED RT-PCR).....	43
4.7	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	43
4.8	ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR.....	44
4.9	SOROTIPIFICAÇÃO.....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	46
5.1	VÍRUS DA LÍNGUA AZUL.....	46
5.1.1	Imunodifusão em gel de Ágar.....	46

<b>5.1.2</b>	<b>RT-PCR em tempo real.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Isolamento viral.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Sorotipificação.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>VÍRUS DA DOENÇA EPIZOÓTICA HEMORRÁGICA.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Semi-nested RT-PCR.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>ADENOVIRUS.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3.1</b>	<b>PCR convencional.....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que detém a maior diversidade de cervídeos do mundo, com oito espécies atualmente reconhecidas, mas com outras que poderão ser identificadas nos próximos anos (PLANO NACIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DOS CERVÍDEOS AMEAÇADOS DE EXTINÇÃO, 2012). Os cervídeos neotropicais ainda são pouco estudados quanto a sua taxonomia, especialmente o gênero *Mazama*. Essa falta de estudos deve-se à dificuldade de acesso aos animais que vivem, em sua maioria, em florestas (DUARTE, 2007).

Programas de manutenção, reprodução e pesquisa de espécies silvestres ameaçadas têm sido implantados no país, o que demonstra a importância de ações coordenadas na conservação da biodiversidade. A criação de cervídeos no Brasil tem sido pouco desenvolvida até o momento, tanto com objetivos de conservação como comerciais. Isso se deve principalmente às dificuldades de manutenção desses animais em cativeiro, sendo comum mortes frequentes e baixa eficiência reprodutiva (GASPARINI; DUARTE; NUNES, 1997).

Um fator importante na redução de populações pequenas de cervídeos são as doenças transmitidas por bovinos. Inúmeras doenças virais e bacterianas comuns ao bovino doméstico afetam os cervídeos. Entretanto, poucas pesquisas nesse campo têm sido feitas para se determinar quais doenças e em que extensão afetam as populações de cervídeos silvestres (PINDEL; LEEUWENBERG, 1997; CHATZOPOULOS et al., 2015).

As doenças hemorrágicas, tais como a doença da língua azul (LA) doença epizoótica hemorrágica (DEH) e doença hemorrágica por adenovírus, tornaram-se preocupantes para os trabalhos de manejo e conservação de cervídeos brasileiros. Várias populações têm sido acometidas por essas enfermidades, que se apresentam de forma sazonal, podendo atingir aproximadamente 40% dos animais em um rebanho e podendo levar os animais a óbito (WERTER; KAWANAMI, 2014). Grande parte do território brasileiro está em zona epidêmica para o BTV (bluetongue virus), que oferece condições climáticas adequadas para o desenvolvimento do vetor. Vários levantamentos, incluindo diferentes espécies de ruminantes domésticos, têm evidenciado sorologia positiva para o BTV em diversos estados brasileiros (TOMICH et al., 2009). A doença da língua azul e a doença epizoótica hemorrágica são consideradas de notificação obrigatória (OFFICES INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014).

O Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) vem reproduzindo com sucesso cervídeos da espécie *Mazama nana*, conhecido popularmente como veado-bororó-do-sul, ou veado-de-mão-curta. Apesar do sucesso reprodutivo, vários animais vieram a óbito, ao longo de anos de criação, com sinais de doenças hemorrágicas (PAN CERVÍDEOS, 2012). A espécie *Mazama nana* não é a única acometida por essa doença no Refúgio Biológico Bela Vista. Desde sua criação, em 1988, diversos espécimes de cervídeos apresentaram sinais clínicos e lesões compatíveis com uma síndrome hemorrágica, incluindo animais das espécies *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* e *Blastocerus dicothomus*. Mesmo com a perda

eventual, mas periódica, de animais, o agente etiológico não havia sido determinado.

Na literatura já foram citadas algumas doenças hemorrágicas que acometem cervídeos, como a língua azul e a doença epizoótica hemorrágica, ambas causadas por orbivirus. Outra enfermidade chamada doença hemorrágica por adenovírus foi descrita por Woods et al. acometendo veados-da-cauda-preta (*Odocoileus hemionus*) na Califórnia e causando a morte de centenas de animais (WERTER; KAWANAMI, 2014). O aspecto macro e microscópico das lesões provocadas por essa doença são semelhantes às encontradas na doença epizoótica hemorrágica e língua azul (WOODS et al., 1996).

Esse trabalho teve como objetivo pesquisar a exposição de cervídeos a vírus causadores de doenças hemorrágicas (doença epizoótica hemorrágica, língua azul, e doença hemorrágica por adenovírus) e identificar o agente viral que causador da morte de cervídeos no Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional, durante o ano de 2014 por meio de testes sorológicos, testes moleculares e isolamento viral a partir de amostras de necropsia e de sangue.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O VEADO-DE-MÃO-CURTA (*Mazama nana*)

O veado-de mão curta (*Mazama nana*) é, provavelmente, o cervídeo brasileiro mais desconhecido pela ciência, e as poucas informações que se têm da espécie, são sua distribuição, taxonomia e genética (DUARTE; REIS, 2012).

É uma espécie de pequeno porte, dificilmente excedendo 15 kg e 45 cm de altura (DUARTE, 2014). Sabe-se que as populações de *M. nana* podem ser encontradas nas florestas de Mata Atlântica do interior, desde o norte do estado do Paraná ao centro do Rio Grande do Sul, adentrando o território do Paraguai e Argentina. O ambiente que ocupava, em sua maioria, deu lugar à agropecuária, o que causou o declínio abrupto no número de indivíduos da espécie (DUARTE, 1996). Não existem estudos sobre a atual distribuição da espécie, mas é certo que passou por uma grande redução devido à exploração da araucária (*Araucaria* sp) e pela expansão das áreas agrícolas. Se considerada a distribuição do habitat natural da espécie, houve redução de aproximadamente 95% da área original da Floresta Ombrófila Mista (ABRIL et al., 2010).

Segundo Abril e Duarte (2008) a espécie *Mazama nana* está classificada globalmente como Dados Insuficientes (*Data deficient - DD*) quanto ao risco de extinção. As ameaças às quais esses animais estão sujeitos segundo Duarte et al. (2012) incluem a fragmentação de seus habitats, prejudicando assim a viabilidade genética da população, a competição com a espécie *Mazama gouazoubira*, que é uma espécie mais bem adaptada a ambientes modificados, a caça ilegal, a predação por cães domésticos e enfermidades transmitidas por bovinos e outros ungulados domésticos, como a LA e DEH. Além da pressão antrópica sobre os relictos florestais remanescentes, as populações enfrentam também problemas genéticos. O polimorfismo cromossômico intra-populacional existente pode

interferir negativamente nos índices reprodutivos, levando a espécie à rápida extinção (DUARTE; REIS, 2012).

## 2.2 DOENÇA DA LÍNGUA AZUL

A LA é uma enfermidade infecciosa, associada à infecção pelo BTV. A doença é transmitida por insetos e caracteriza-se por inflamação das mucosas, hemorragia e edema generalizado (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007).

Taxonomicamente o BTV é classificado como pertencente ao gênero Orbivirus da família *Reoviridae*, sendo uma das 22 espécies reconhecidas do gênero, que também inclui o vírus da doença epizoótica hemorrágica (EHDV), encefalomielite equina e o vírus da doença equina africana (AHS). Atualmente, são reconhecidos 26 sorotipos de BTV, incluindo o vírus Toggenburg (BTV 25) e o BTV 26 do Kuwait. (OFFICES INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014).

A LA foi identificada pela primeira vez na África do Sul na virada do século XX, porém foi apenas em 1943, quando ocorreu um surto em Chipre, que a doença foi registrada em outros continentes (GIBBS; GREINER, 1994). O BTV ocorre em várias partes do mundo, incluindo África, Europa, Oriente Médio, Austrália, Pacífico Sul, América do Norte, América do Sul e partes da Ásia, podendo estar presente em algumas regiões, sem estar associado a doença clínica (WERTHER; KAWANAMI, 2014). A LA no Brasil, foi notificada ao “Office International des Epizooties” em 1978, com base em evidências sorológicas provenientes de amostras de bovinos (ARIDA; MORATO; DUARTE, 1997).

Essa doença acomete uma grande variedade de ruminantes domésticos e selvagens, sendo a espécie ovina a mais atingida dentre os animais domésticos. Em bovinos e caprinos, a doença é geralmente inaparente, (ARIDA; MORATO; DUARTE, 1997; DUARTE, 2007) enquanto a doença aguda

está classicamente associada a ovinos e cervídeos (WERTHER; KAWANAMI, 2014).

O vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides sp.*, que possuem grande variação de hábitos alimentares, preferência por hospedeiros e competência na transmissão da infecção. No Brasil, os mosquitos *Culicoides sp.* são denominados “maruim”, “mosquito pólvora” ou “mosquitos do mangue”. Os mosquitos adquirem o vírus quando ingerem o sangue de um hospedeiro virêmico. Estações quentes e úmidas favorecem o aparecimento dos *Culicoides* e, consequentemente, a maior transmissão do vírus (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007). Porém no Brasil, a prevalência de vetores em potencial de LA e DEH é incerta (DUARTE et al., 2001). O vírus também pode ser transmitido por sêmen de animais infectados (BOWEN et al., 1983; HOWARD; BOWEN; PICKET., 1984). Outros estudos revelaram que o BTV foi encontrado no sêmen de touros, porém somente durante o período de viremia (ROEDER et al., 1991).

A transmissão vertical tem sido observada em bovinos e ovinos infectados naturalmente ou experimentalmente. A transmissão transplacentária depende das características da cepa viral, da concentração e do estágio gestacional, sendo que, se ocorrer no início da gestação, pode provocar morte do embrião. No caso de sobrevivência do feto, pode-se instalar estado de tolerância imunológica em que o animal ao nascer não apresenta capacidade de produzir anticorpos específicos para o vírus da língua azul, situação de grande importância epidemiológica (ARIDA; MORATO; DUARTE, 1997).

Os vírus na circulação estão associados às células, sendo a maioria encontrada nos eritrócitos. Estudos *in vitro* demonstraram replicação viral em monócitos, macrófagos e linfócitos. O período de incubação varia de 10 a 20 dias e os surtos são mais comuns no final do verão e no começo do outono (WERTHER; KAWANAMI, 2014).

Os sinais clínicos, quando ocorrem, incluem decaimento do cérvo, respiração ofegante, estado febril, alta temperatura e salivação intensa, como nas outras espécies de animais. A hiperemia e congestão dos lábios e das mucosas oral e nasal podem variar de leve aumento da tonalidade vermelho escuro até a coloração cianótica, de onde se origina o termo “língua azul” (ARIDA; MORATO; DUARTE, 1997). Os achados patológicos da enfermidade causada pelo BTV estão relacionados com as lesões do endotélio vascular, que resultam na sua fragilização e em alterações da permeabilidade vascular. Essas alterações resultam em edema, congestão, hemorragia, inflamação e necrose. Nos cervídeos, as lesões mais evidentes são petequias e equimoses disseminadas por vários órgãos e tecidos. Animais com úlceras necróticas na cavidade oral e lesões nos cascos podem ser encontrados nos casos em que o curso da doença é mais prolongado (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007; DROLET et al., 2013). Os achados histopatológicos podem incluir infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de micromineralização de fibras musculares e focos hemorrágicos na musculatura esofágica, hiperplasia linfoide de linfonodos, baço e tonsilas, necrose em tecido hepático e vacuolização hepatocelular difusa moderada (ANTONIASSI et al., 2010; DROLET et al., 2013).

Todos os sorotipos compartilham抗ígenos de grupos comuns e induzem ao desenvolvimento de anticorpos, que podem ser reconhecidos por fixação do complemento (FC), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e teste do antígeno fluorescente indireto (AF). Após infecção, observa-se também o desenvolvimento de anticorpos de neutralização viral, estes, são predominantemente específicos do sorotipo, mas foi observada reação cruzada (STOTT, 2003). As técnicas preconizadas pela OIE (2014) incluem o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e as técnicas de RT-PCR e RTq-PCR.

Não há tratamento específico para a LA ou para a DEH, aconselhando-se diminuir o estresse do animal, confinando-o em

áreas protegidas e secas (WERTHER; KAWANAMI, 2014). Antonassi et al. (2010) descreveram a recuperação de dois ovinos que apresentavam a doença, depois de tratamento com dipirona sódica, penicilina e acetato de dexametasona, porém os autores salientaram que os animais apresentavam uma forma branda da doença. Como a LA é transmitida por insetos, seu controle torna-se difícil. Em algumas circunstâncias, exposição a mosquitos picadores pode ser reduzida mediante a remoção de animais de áreas infectadas, tratamento com repelentes de insetos e alojamento de animais em abrigos (STOTT, 2003). O uso da vacinação em áreas onde a LA se constitui em problema sanitário é a medida mais frequentemente adotada (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007; BHANUPRAKASH et al., 2009)

A vacina inativada para a LA está disponível em alguns países da União Europeia, Índia, EUA e China. As vacinas inativadas são consideradas mais seguras, mas estão cercadas de contraindicações, como a possibilidade de inativação incompleta, a necessidade de reforço e o custo da produção. Vacinas vivas atenuadas estão sendo utilizadas na África do Sul, e seu uso é limitado nos EUA e em alguns países da União Europeia. As vacinas vivas atenuadas para LA são fáceis de produzir, econômicas e uma única dose é suficiente para a produção de uma resposta imune satisfatória. Porém, efeitos secundários à vacina podem incluir, transtornos reprodutivos, infecção e teratogenia do feto e o aparecimento de doenças em algumas raças suscetíveis de ovinos, além disso, o vetor pode carrear novos sorotipos, havendo rearranjos entre o sorotipo da vacina e os presentes no campo (BHANUPRAKASH et al., 2009).

## 2.3 DOENÇA EPIZOÓTICA HEMORRÁGICA

A doença epizoótica hemorrágica dos cervídeos é uma doença aguda, frequentemente fatal, que acomete alguns ruminantes silvestres, principalmente os cervídeos. Nos bovinos, a infecção raramente é acompanhada por sinais clínicos. A doença é causada pelo EHDV (*epizootic hemorrhagic disease virus*), um membro do gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae* (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007; TEMIZEL et al., 2009). São 7 sorotipos atualmente reconhecidos, porém ainda não a consenso sobre o número exatos de sorotipos de EHDV (OIE, 2014). A doença epizoótica hemorrágica foi descrita na América do Norte, Austrália, Ásia e África, tendo sido encontrados animais soropositivos na América do Sul (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007; WERTHER; KAWANAMI, 2014). Em 2008, foi realizado o isolamento do EHDV no Brasil, em um caso que ocorreu em dois animais do gênero *Mazama* no Zoológico de Pomerode – SC (FAVERO et al., 2013).

Segundo Wherther; Kawanami (2014), tanto a DEH quanto a língua azul produzem uma síndrome hemorrágica parecida, sendo que a epidemiologia de ambas enfermidades está relacionada com a presença de vetores transmissores, dípteros do gênero *Culicoides*. Surtos das doenças causadas pelo EHDV são descritos principalmente no final do verão e no início do outono, épocas de maior população de vetores. Cervídeos infectados podem permanecer virêmicos por até dois meses, atuando nesse período como reservatórios e fontes de infecção (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007; MULLEN; HAYES; NUSBAUM, 1985).

Assim como ocorre com o BTV, o EHDV pode atravessar a placenta e infectar o feto em desenvolvimento. O efeito depende da idade gestacional. Infecções no primeiro semestre podem resultar em morte fetal. À medida que a idade gestacional aumenta, a infecção pode provocar aborto,

natimortos, nascimento de animais com deficiências físicas ou deformações, ou nascimento de animais assintomáticos e, algumas vezes, virêmicos (STOTT, 2003)

O período de incubação da DEH é de 10 a 15 dias (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2006). O período de viremia pode se prolongar além dos 50 dias, mesmo na presença de anticorpos neutralizantes, devido à íntima relação existente entre o vírus e os eritrócitos (OIE, 2009).

A DEH em cervídeos pode manifestar-se clinicamente de três formas distintas: superaguda, aguda e crônica. A doença superaguda é caracterizada por febre alta, anorexia, fraqueza, dificuldade respiratória e edema grave e rápido da cabeça e do pescoço, sendo que inchaços na língua e conjuntiva são comuns. Na forma aguda (clássica), os sinais clínicos podem estar acompanhados por extensas hemorragias em tecidos como pele, trato gastrointestinal e endocárdio. Geralmente há sialorreia e descarga nasal de aspecto sanguinolento. Os animais podem desenvolver úlceras e erosões na língua, no palato, na gengiva, no rúmen e no omaso. Cêtre-Sossah et al. (2014) também citam sinais clínicos como pirexia, hiperemia, edema, ulcerações orais, ptialismo, úlceras nasais e excessiva secreção ocular e hipersalivação. A mortalidade pode ser elevada nas duas primeiras formas, sendo que mais de 90% dos animais infectados morrem entre 8 e 36 horas após o início dos sinais clínicos. Na forma crônica da DEH, o animal permanece doente durante várias semanas, porém se recupera gradualmente. Depois da recuperação, pode desenvolver anéis nos cascos, causados por interrupções no crescimento, podendo apresentar claudicação. Podem também desenvolver úlceras, cicatrizes ou erosões no rúmen provocando emaciação (WERTHER; KAWANAMI, 2014).

Os achados macroscópicos e microscópicos da DEH são caracterizados por hemorragias, que vão desde petéquias e equimoses, e envolvem diferentes tecidos e órgãos, sendo mais frequente o envolvimento do coração, fígado, baço, rim, pulmão

e trato gastrointestinal. Edema generalizado e aumento do fluido pericárdico são achados frequentes (ALFIERI; TAKIUCHI; LOBATO, 2007; FISCHER et al., 1995).

O diagnóstico da LAe da DEH envolve o isolamento viral, a detecção de anticorpos específicos no soro do animal ou, ainda, detecção do genoma viral em amostras biológicas colhidas de animais doentes ou mortos, com sinais clínicos dessas enfermidades. Em cervídeos, os tecidos preferenciais para isolamento viral são baço, linfonodos e sangue total. A técnica de reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) tem a vantagem de poder ser realizada em tecidos impróprios para o isolamento. Os ensaios sorológicos realizados são: teste imunoenzimático de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), soroneutralização e IDGA, porém pode ocorrer reação cruzada, não sendo possível distinguir de forma consistente qual o agente envolvido (WERTHER; KAWANAMI, 2014).

Vacinas vivas atenuadas podem ser utilizadas contra a infecção EHDV, entretanto só estão disponíveis comercialmente vacinas contra o EHDV 2. Novos estudos têm demonstrado a eficácia de anticorpos gerados a partir de proteínas do capsídeo viral (VP1, VP3, VP5 e VP7) contra mais de um sorotipo (ALSHAIKHAHMED; ROY, 2016). São necessárias mais investigações sobre a ocorrência da LA e a DEH em cervídeos na América do Sul, incluindo o diagnóstico por testes sorológicos, isolamento viral, detecção de ácidos nucleicos, sorotipificação e caracterização do vetor para estabelecer dados epidemiológicos confiáveis e melhorar as medidas de controle dessas doenças. Apesar da epidemiologia incerta, a LA e DEH têm sido consideradas duas das mais importantes doenças de ruminantes selvagens nos últimos 10 anos. Além disso, considera-se que as duas viroses estão amplamente distribuídas na América do Sul (DUARTE et al., 2001).

## 2.4 DOENÇA HEMORRÁGICA POR ADENOVIRUS

Segundo Wherther e Kawanami (2014), a doença é causada por um vírus da família *Adenoviridae*, gênero *Atadenovirus*. Essa família abriga um grupo de vírus icosaédricos grandes, sem envelope, com genoma DNA fita dupla linear. Os adenovírus geralmente causam infecções inaparentes ou sinais clínicos leves, autolimitantes e são considerados estritamente espécie-específicos. Entretanto, alguns adenovírus são oportunistas e causam infecções em associação com outros agentes, ou servindo como fatores predisponentes para infecções secundárias virais ou bacterianas (MORAES; COSTA, 2007). O agente tem tropismo pelo epitélio ou endotélio de vasos dos tratos respiratório e digestivo (WERTHER; KAWANAMI, 2014)

Em 1993, um adenovírus foi identificado como a causa de morte de centenas de cervídeos da espécie *Odocoileus hemionus (mule deer)* de vida livre na Califórnia (WOODS et al., 1996). O diagnóstico laboratorial do material proveniente desse surto foi baseado na detecção de antígenos virais nos tecidos, por imunofluorescência indireta (IFA), e pela detecção do vírus por microscopia eletrônica (MORAES; COSTA, 2007). A partir disso, foram realizadas infecções experimentais com a inoculação do adenovírus isolado do *Odocoileus hemionus* (OdAdV-1) em exemplares de veados-de-cauda-preta (*Odocoileus hemionus columbianus*) (Woods et al., 1999). O adenovírus também foi citado como causa da morte de veados-da-cauda branca (*Odocoileus virginianus*) que apresentaram edema pulmonar em casos esporádicos (SORDEN; WOODS; LEHMKUHL, 2000) e como causador da morte de alces mantidos em cativeiro no Canadá (SHILTON et al., 2002).

Trata-se de uma doença contagiosa cuja epidemiologia ainda não está totalmente elucidada. A entrada do agente provavelmente ocorre por contato, principalmente com as mucosas (respiratória, digestiva, ocular), como foi testado em

infecções experimentais nas quais a doença foi reproduzida após inoculações intranasal, intra-traqueal, oral e ocular, além da via intravenosa (WERTHER; KAWANAMI, 2014; WOODS et al., 1999). Os sinais clínicos apresentados nos animais infectados experimentalmente variam, sendo discretos ou ausentes, podendo haver ptialismo, diarreia, convulsão e decúbito (WERTHER; KAWANAMI, 2014), além de hemorragia sistêmica generalizada (WOODS et al., 1999).

Na necropsia, os animais afetados demonstraram edema pulmonar e hemorragia em lúmen intestinal. Alguns animais apresentaram áreas necróticas em várias regiões das cavidades oral e nasal, mandíbula e maxila e nos quatro compartimentos do estômago. A língua e estômago podem apresentar úlceras (WOODS et al., 1999).

O diagnóstico de adenovírus tem como base achados de necropsia, isolamento viral, identificação por microscopia eletrônica de transmissão ou varredura, testes de anticorpos fluorescentes e imuno-histoquímica (WERTHER; KAWANAMI, 2014). A técnica de PCR é utilizada no diagnóstico de adenovírus canino CAdV-1 e CAdV-2 e de adenovírus equino (MORAES; COSTA, 2007) e para um diagnóstico rápido de adenovírus humano (HEIM et al., 2003). Em 2012 foi realizado o primeiro estudo retrospectivo de pesquisa de adenovírus em cervídeos brasileiros. Amostras de tecido de animais que foram necropsiados no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica e todos os resultados foram negativos (KAWANAMI, 2012).

Como não existe tratamento específico, pode-se instituir terapia de suporte para melhorar a condição física do animal, mas, na maioria das vezes, a evolução da doença é muito rápida e o animal vêm a óbito (WERTHER; KAWANAMI, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Fazer uma investigação sorológica e molecular de doenças hemorrágicas em uma população de cervídeos mantidos em cativeiro e determinar o agente etiológico responsável pela morte de cervídeos mantidos em cativeiro no criadouro de animais silvestres e zoológico da Itaipu Binacional, os quais apresentaram quadro clínico de doença hemorrágica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a prevalência de anticorpos contra o BTV em veados-bororós mantidos no zoológico Roberto Vilas Lange e no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.

Pesquisar animais virêmicos no plantel.

Pesquisar a presença do BTV e EHDV e adenovírus dos cervídeos nas amostras de órgãos provenientes de animais que vieram a óbito com sinais de doença hemorrágica.

Isolar e sorotipificar o/os vírus presentes nas amostras de sangue e tecido enviadas ao laboratório.

Identificar as principais lesões macroscópicas encontradas nas necropsias dos animais infectados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal – CETEA da Universidade do Estado de Santa Catarina, segundo protocolo 01.70.14.

Autorização SISBIO número 50068-1.

### 4.1 CAPTURA DOS ANIMAIS E COLHEITA DE AMOSTRAS

Os animais utilizados nesse estudo foram exemplares de veado-bororó (*Mazama nana*) mantidos em cativeiro no Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional. Foram utilizados animais tanto do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional quanto do Zoológico Roberto Ribas Lange. As amostras foram coletadas nos meses de verão de 2015. Ao todo foram capturados todos os 32 veados-bororós presentes no Refúgio Biológico Bela Vista, de idade entre um mês e 15 anos, de ambos os性os. Os cervídeos estavam identificados com brincos numerados. Com o objetivo de submeter os animais ao mínimo estresse possível, a sequência de captura dos animais era definida pela equipe com antecedência. O protocolo anestésico utilizado consistia de 7mg/kg de cetamina, e 100 µg/kg demetomidina. Antes do início do procedimento de captura era estimado o peso de cada animal para cálculo do volume de anestésico.

#### 4.1.1 Animais do CASIB

Os animais mantidos no criadouro estavam alojados em recintos de aproximadamente 30 x15m. Cada recinto mantinha 2 a 4 animais.

Uma vez selecionado, o animal era conduzido calmamente pelo tratador até um corredor de manejo. No final

desse corredor havia um curral cercado com tela de alambrado, revestido com lona preta, para reduzir o estímulo luminoso e manter o animal calmo. Uma vez que o animal estivesse preso, uma pessoa treinada da equipe entrava calmamente no curral e, utilizando uma zarabatana, soprava um dardo contendo os agentes anestésicos calculados para o peso estimado do animal. Uma vez feito isso, o atirador se retirava do recinto e esperava com o resto da equipe a aproximadamente 40 metros de distância em silêncio. Após um período de aproximadamente 15 minutos, a equipe aproximava-se do animal e verificava se a contenção química tinha sido efetiva e aferia os parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatur e, pressão arterial) e reflexo palpebral.

O animal era então colocado em uma maca para transporte até o veículo que o levaria ao hospital veterinário. Ao chegar no hospital, o animal era pesado e levado até o ambulatório, onde era fotografado e passava por exame físico. Os parâmetros fisiológicos eram aferidos a cada cinco minutos, quando possível, era aferida a pressão arterial com a utilização de um Doppler, para auxiliar na monitoração anestésica (Figura 1).

A colheita de sangue era realizada na veia jugular após tricotomia e antisepsia da região. Utilizando sistema de colheita a vácuo, eram colhidas amostras em dois tubos de 3 mL com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e um tubo de 10 mL sem anticoagulante.

Após esse procedimento, o animal era colocado em uma caixa de transporte de madeira, própria para manejo de animais silvestres de porte médio, onde era monitorado até o fim da recuperação anestésica. Uma vez que o animal estivesse recobrando a consciência, a caixa era fechada e mantida em uma sala com temperatura controlada, em torno dos 23°C.

Uma vez que estivesse completamente recuperado, o animal era encaminhado ao seu recinto original, solto e seu

comportamento era monitorado por um tratador durante algumas horas.

Figura 1- Exemplar macho de *Mazama nana*, sob efeito da contenção química para colheita de sangue e exame físico.



Fonte: próprio autor

#### 4.1.2 Animais do zoológico.

Seis animais eram mantidos em um recinto coletivo (40 x 50 m de comprimento, aproximadamente), com seis animais

Para a captura o tratador do zoológico fechava o animal selecionado em uma baia, com comunicação para a área de cambiamento. Uma pessoa da equipe aproximava-se do animal e esperava até que ele estivesse em posição favorável para atirar o dardo anestésico com a zarabatana. A equipe então esperava em silêncio no lado de dentro do cambiamento e observava o animal até que ele estivesse em decúbito lateral, sem consciência e sem reflexos musculares esqueléticos. A partir desse momento,

o procedimento era realizado da mesma forma que para os animais do CASIB.

## 4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ENVIO AO LABORATÓRIO.

### 4.2.1 Separação do soro.

As amostras de sangue coletadas sem anticoagulante eram mantidas a temperatura ambiente por uma ou duas horas, até a completa formação do coágulo e, então, transportadas em caixa de isopor refrigerada até o Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional.

O sangue era centrifugado a 1100g por 15 minutos e o soro transferido para outro tubo sem anticoagulante devidamente identificado com o código do animal e a hora da coleta e armazenado a -20°C.

### 4.2.2 Lavado de eritrócitos.

As amostras de sangue eram colhidas com anticoagulante em tubos de 4 mL com EDTA homogeneizado delicadamente invertendo-se os tubos. Os tubos eram então armazenados a 4°C e transportados refrigerados a 4°C até o Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional. Um dos animais, identificado como CASIB 2534 veio a óbito com sinais de hemorragia generalizada 15 dias depois da colheita (Figura 2 e 3). Desse indivíduo, foi coletada uma segunda amostra de sangue por via intracardíaca logo após a morte do animal.

O sangue então passava pelo protocolo de lavagem de hemácias indicado pelo Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal da UFMG, as amostras refrigeradas eram centrifugadas a 1500g por 10 minutos. Depois dessa fase, a altura total do plasma era marcada e o plasma sobrenadante era retirado. O sedimento era então ressuspensido com solução de PBS, e depois de homogeneizada, a solução passava novamente por

esse processo mais duas vezes. Por fim, o sedimento era novamente ressuspendido com PBS e as amostras eram armazenadas a 4°C.

Ao final do procedimento, o lavado de hemácias era transferido para tubos de microcentrífuga devidamente identificados, que ficavam armazenados a 4°C.

Figura 2- Animal identificado como CASIB 2534 apresentando edema sublingual e baixo nível de consciência.



Fonte: próprio autor

Figura 3- CASIB 2534 apresentando sangue em região perianal momentos antes do óbito.



Fonte: próprio autor

#### 4.3 COLHEITA E SEPARAÇÃO DO MATERIAL DE NECRÓPSIA

Dos quatro animais que morreram com sinais de doença hemorrágica a partir de 2014, foi coletado uma duplicata do coração, pulmão, esôfago, fígado e linfonodos. Esse material foi congelado a -20°C. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), refrigeradas, em caixas de isopor com gelo reciclável. Na necropsia, as lesões macroscópicas foram descritas e fotografadas.

#### 4.4 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

Os testes sorológicos (IDGA para BTV) e moleculares (RT-qPCR para BTV e semi-nested PCR para EHDV) e o isolamento viral (cultivo celular para BTV) foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zélia Lobato.

Na técnica de IDGA foi utilizado o antígeno solúvel grupo específico do BTV, que detecta anticorpos induzidos. A detecção se fez pela observação de uma linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste e da linha de identidade entre o soro teste com o soro controle positivo, em gel de agarose (reação anticorpo-antígeno). A técnica foi realizada em lâminas de microscopia. O gel 0,9% (p/v) foi preparado em solução 0,85% (p/v) NaCl, fundido em microondas e adicionando 5 mL em cada lâmina, as mesmas foram mantidas abertas em temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) em superfície nivelada até gelficar.

O padrão de perfuração utilizado consistia de seis orifícios na periferia e um central, com diâmetro externo de 4 mm e separados a 2 mm equidistantes entre si.

O antígeno diluído foi colocado no orifício central e o soro controle positivo nos três orifícios alternados (sentido horário), tomando-se como referência o orifício superior. Os soros testes foram adicionados nos três orifícios periféricos restantes.

O volume de soro e de antígeno por orifício foi de 27  $\mu\text{L}$ , uma ponteira para cada amostra. Após este procedimento as placas foram mantidas em uma estufa com fonte de umidade em superfície nivelada e incubadas em temperatura ambiente, durante 48 horas, quando foi realizada a leitura.

#### 4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA BTV.

Para investigar a presença de BTV o método utilizado foi o de RT-PCR em tempo real. Para a extração de RNA foi utilizada uma alíquota de 300 µl a partir de cada amostra de lavado de hemárias além de outra alíquotas de tecidos macerados (coração, pulmão, fígado, linfonodos) separadas de 1 cm<sup>3</sup>. Foi utilizado TRIZOL (Life Technologies Inc) para a extração de RNA seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos de RNA foram ressuspensos em 30 µl de água ultra purificada. Para controle positivo foi utilizado uma alíquota de 250µl de sobrenadante de cultura celular. Os RNA's foram ressuspensos em 30µl de água livre de nucleases.

Após a extração foi realizado o RT-PCR utilizando primers específicos para o gene do segmento S10 que codifica a proteína não estrutural NS3 do BTV. Todas as etapas e primers seguiram o protocolo de Orru et al. (2006). (Tabela 1). As etapas do teste de RTq-PCR incluindo a transcrição reversa foram realizadas com o uso do “LightCycler RNA Amplification Kit Hybridisation Probes” seguindo as orientações do fabricante. O volume final da mistura de reação foi de 20µl e continha: 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25µM de cada primer, 10 µM de LF1MB e 2µl do RNA extraído das amostras. A máquina utilizada foi ViiA 7 Real Time PCR System da Applied Biosystem. O programa de PCR utilizado tinha os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de cdRNA a 95°C durante 30s; fase de transcrição reversa a 55°C durante 10 min; fase de desnaturação a 95 °C durante 30s, e 45 ciclos de 95°C por 10s, 10s a 47°C e 4s a 72°C.

#### 4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEMI NESTED PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (SEMI-NESTED RT-PCR)

Para identificar a presença de material genético do EHDV nas amostras de sangue e tecido foi realizado RT-PCR semi-nested utilizando material, reagentes e protocolo segundo o padronizado por Murphy et al., 2005. Amostras do *pool* de órgãos e lavados de hemácias tiveram o RNA extraído pelo método trizol. Foram submetidas a RT-PCR *semi-nested* para amplificação de um fragmento do gene S10 que codifica a NS3/NS3A do VDHE. Os Primers utilizados estão descritos na Tabela 1. O programação do termociclador na reação de transcrição reversa foi: 1h a 42°C, seguido de 5min a 95°C. O cDNA foi amplificado por PCR utilizando os primers específicos e seguindo a seguinte programação do termociclador: 2 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 48 °C, 1 min 70°C, e por fim, um ciclo de 10 min a 70 °C.

#### 4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

As amostras de tecido provenientes de animais que morreram com sinais de doença hemorrágica foram submetidas ao teste de PCR convencional para o adenovírus de cervídeos. O protocolo utilizado foi o descrito por Lapointe et al. (1999). O DNA presente nas amostras de tecido foi extraído utilizando um kit comercial (QIAamp Tissue Kit, Qiagen). DNA viral foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers degenerados concebidos para amplificar um segmento de 256 pb de uma área conservada do gene do hexon (Tabela 1). A amplificação foi realizada em 100 ml de reagentes, contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP, 0,6mM de cada primer, 2,5 U de AmpliTaq polymerase (Perkin-Elmer), e aproximadamente 500ng de DNA molde. As amostras foram

aquecidas a 94° C durante 5 min, em seguida submetidas a 45 ciclos de amplificação (1 min a 94° C, 1 min a 50° C, 1 min a 72°C) e uma fase final de alongamento a 72° C durante 7 min, utilizando o termociclador. Os produtos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

#### 4.8 ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR

As amostras positivas para BTV no teste de RTq-PCR em tempo real ( $C_t < 30$ ) passavam pelo procedimento de isolamento viral. Eram inoculadas 0,5ml de uma diluição de  $10^{-1}$  em uma monocamada de células de larvas de *Culicoides variipennis* (células KC). Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado o volume apropriado de meio de Schneider (Suplementado com FCS a 10%). Os frascos inoculados foram incubados a 28,8 °C durante 7 dias. As células foram então lisadas por congelamento e descongelamento e foram analisadas por RTq-PCR para verificar a presença do vírus. Se o ciclo o valor limiar ( $C_t$ ) era  $> 30$ , uma segunda passagem era realizada. Se o  $C_t$  era  $< 30$ , as células sobrenadantes eram inoculadas com células VERO seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Os frascos inoculados eram mantidos a 37°C e examinados a cada sete dias a procura de efeitos citopáticos, quando observado, as células sobrenadante passavam por mais uma reação de RTq-PCR e se o  $C_t$  era  $< 30$  era confirmado o isolamento viral.

#### 4.9 SOROTIPIFICAÇÃO

Para a sorotipificação do isolado foi realizada reação de RT-PCR convencional para ampliação do segmento 2 do RNA viral (VP2). Os *primers* utilizados para a identificação dos subgrupos foram baseados em sequencias do GenBank assim como foi descrito por Viarouge et al. (2014). Foi utilizado o kit SuperScriptTM III one-step RT-PCR system (Invitrogen) com

alta fidelidade platinum seguindo o protocolo descrito por Maan et al. (2012).

Baseados no resultado do RT-PCR convencional o vírus isolado era classificado em um dos subgrupos. Em seguida era realizado RT-PCR com *primers* específicos para cada sorotipo pertencente ao grupo identificado, utilizando o protocolo descrito por Maan et al. (2012).

Tabela 1- Primers utilizados nos testes de identificação viral.

Vírus	Primers	Referência
EHDV	<b>1<sup>a</sup> reação</b> P1-5'TTAAAAAGAGGTTGGCATC3' P2-5'GTGTGTCGAGGATGGCATA3' <b>2<sup>a</sup> reação</b> P1-5'TTAAAAAGAGGTTGGCATC3' P3-5'AACGCCTCCGCATACGAAGC3'	Murphy et al., 2005
Adenovirus	P1-5'GCCGCARTGGTCYTACA TGCACA3' P2-5'AGSGTDCCSCGGATGTCAA3'	Lapointe et al. (1999)
BTV	P1-5'AYAAAGCGATGTAAA'3 P2-5-TCATCACGAAACGCTTC-3	Orrù et al. (2006)

Fonte: Arquivo pessoal

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VÍRUS DA LÍNGUA AZUL

#### 5.1.1 Imunodifusão em gel de agarose

Das 32 amostras de soro testadas, apenas uma teve resultado positivo para BTV, representando 3,12% do total de amostras. Se tratava de um animal macho de 2 anos de idade, nascido no refúgio.

#### 5.1.2 RT-PCR em tempo real

Nas amostras de sangue colhidas dos 32 animais que não apresentavam sinais clínicos, não houve nenhum resultado positivo, ou seja, nenhum animal apresentava-se virêmico no momento da colheita.

O resultado do RT-PCR em tempo real foi positivo tanto para o lavado de hemácias quanto para a amostra de tecido macerado do CASIB 2534, apresentando Ct (threshold cycle) < 30 nos dois casos (Figura 4).

Entre os meses de abril e junho do mesmo ano, mais três animais da espécie *Mazama nana* vieram a óbito com sinais clínicos e lesões compatíveis com doenças hemorrágicas. Os animais foram identificados como CASIB 2433, CASIB 2583 e CASIB 2490. As amostras de tecidos (fígado, baço, coração) foram congeladas e enviadas ao laboratório de virologia animal UFMG. O resultado do RT-PCR em tempo real para o segmento S10 foi positivo para BTV nas amostras dos três animais (Figura 5). As lesões macroscópicas encontradas durante a necropsia dos animais estão descritas na Tabela 2. As figuras 4 e 5 mostram lesões macroscópicas na necropsia do animal CASIB 2534.

### **5.1.3 Isolamento viral**

As amostras coletadas do CASIB 2534, CASIB 2433 e CASIB 2583 e CASIB 2490 passaram pelo processo de isolamento viral em cultivo de células, nesse processo as três primeiras amostras foram positivas, com o teste de RTq-PCR do isolado em cultivo celular apresentando Ct <30 sendo considerado o isolamento de BTV como mostra a figura 6 e 7. O material coletado do animal CASIB 2490 não foi passível de isolamento.

### **5.1.4 Sorotipificação**

As amostras de BTV isolado em cultivo celular provenientes das amostras positivas para o teste de RTq-PCR passaram pelo processo de sorotipificação. O BTV isolado da amostra do CASIB 2534 apresentou amplificação do segmento com 543pb. Utilizando *primers* específicos no teste de RT-PCR em tempo real, foi possível identificar que pertencia ao sorotípico BTV18. O isolado das amostras do CASIB 2433 apresentou amplificação do segmento de 848pb no teste de RT-PCR convencional, sendo identificado como BTV3 na reação de RT-PCR com *primers* específicos. A amostra de BTV isolada do animal CASIB 2483 foi identificado como tendo segmento amplificado de 716 pb e, após o teste de RT-PCR em tempo real, foi identificado como pertencente ao sorotípico BTV14.

## **5.2 VÍRUS DA DOENÇA EPIZOÓTICA HEMORRÁGICA**

### **5.2.1 Semi-nested RT-PCR**

Nenhuma das amostras de lavado de hemácia ou tecido macerado foram positivas para EHDV no teste de RT-PCR *semi-nested*.

## 5.3 ADENOVIRUS

### 5.3.1 PCR convencional

Nenhuma das amostras de tecido testadas para o adenovírus de cervídeos tiveram resultado positivo no teste de PCR convencional.

Tabela 2- Alterações macroscópicas nos cadáveres dos veados-bororós positivos para BTV no teste de RT-PCR

Identificação	Sexo	Idade aproximada	Alterações macroscópicas
CASIB 2534	F	2 anos	<p>Edema submandibular e sublingual</p> <p><b>Cavidade abdominal:</b> sangue livre</p> <p><b>Intestino:</b> Conteúdo hemorrágico</p> <p><b>Pulmão:</b> congestão e edema</p> <p><b>Coração:</b> hemorragias multifocais</p> <p><b>Rins:</b> hemorragia difusa</p>
CASIB 2433	F	5 anos	<p>Sangue na esclera ocular</p> <p><b>Cavidade abdominal:</b> líquido sanguinolento</p> <p><b>Cavidade oral:</b> sangue, petéquias e edema de língua</p> <p><b>Estômagos:</b> petéquias difusas em serosa e mucosa</p> <p><b>Pulmões:</b> hemorrágicos</p> <p><b>Coração:</b> saco pericárdico com líquido sanguinolento sufusões e petéquias em superfície cardíaca</p> <p><b>Rins:</b> hemorrágicos</p>

Continua

Continuação

Tabela 2 - Alterações macroscópicas nos cadáveres dos veados-bororós positivos para BTV.

CASIB 2583	F	7 meses	<p>Sangue na esclera ocular  <b>Cavidade oral:</b> sangue, petéquias na língua  <b>Estômagos:</b> serosas hemorrágicas, petéquias e sufusões difusas  <b>Intestino:</b> segmento intestinal hemorrágico  <b>Pulmões:</b> hemorrágicos e enfisematosos  <b>Coração:</b> petéquias em miocárdio  <b>Rins:</b> hemorrágicos</p>
CASIB 2490	M	3 anos	<p><b>Cavidade oral:</b> sangue, edema submandibular  <b>Estômagos:</b> serosas hemorrágicas, petéquias e sufusões  <b>Intestino:</b> conteúdo hemorrágico  <b>Cavidade torácica:</b> hemotórax  <b>Traqueia:</b> vasos congestos, petéquias  <b>Pulmões:</b> hemorragia difusa e enfisema  <b>Coração:</b> líquido amarelado em saco pericárdico, petéquias e equimoses em pericárdio, miocárdio e endocárdio  <b>Rins:</b> hemorrágicos</p>

Fonte: arquivo pessoal.

Figura 4- Trato gastrointestinal do animal CASIB 2534 apresentando segmentos hemorrágicos.



Fonte: próprio autor

Figura 5- Área de sufusão em miocárdio do animal CASIB 2534.



Fonte: próprio autor

Figura 6- Imagem do gráfico gerado pelo software mostrando as curvas de dissociação no teste de RTq-PCR das amostras de sangue e tecido provenientes do animal CASIB 2534.

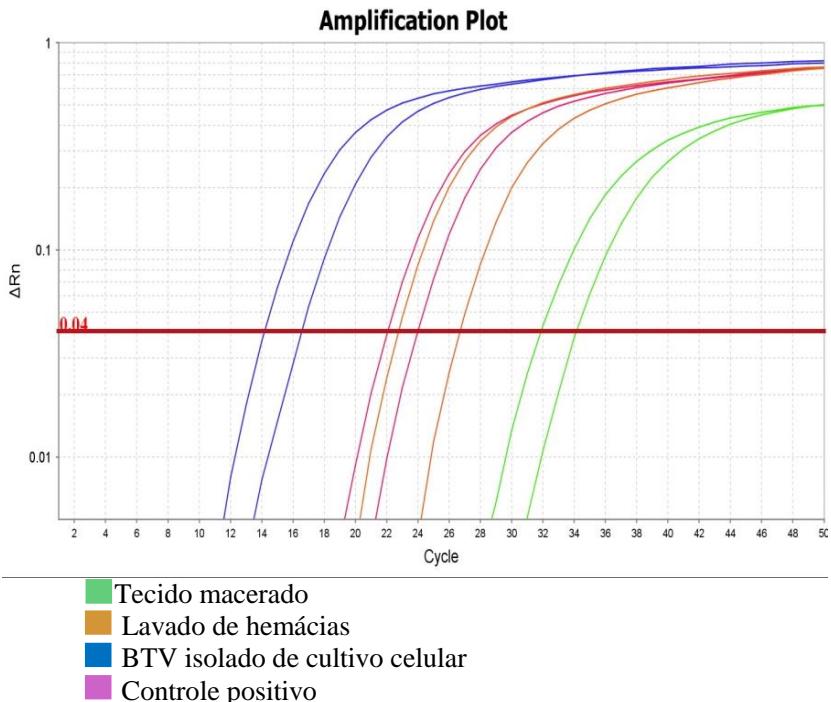
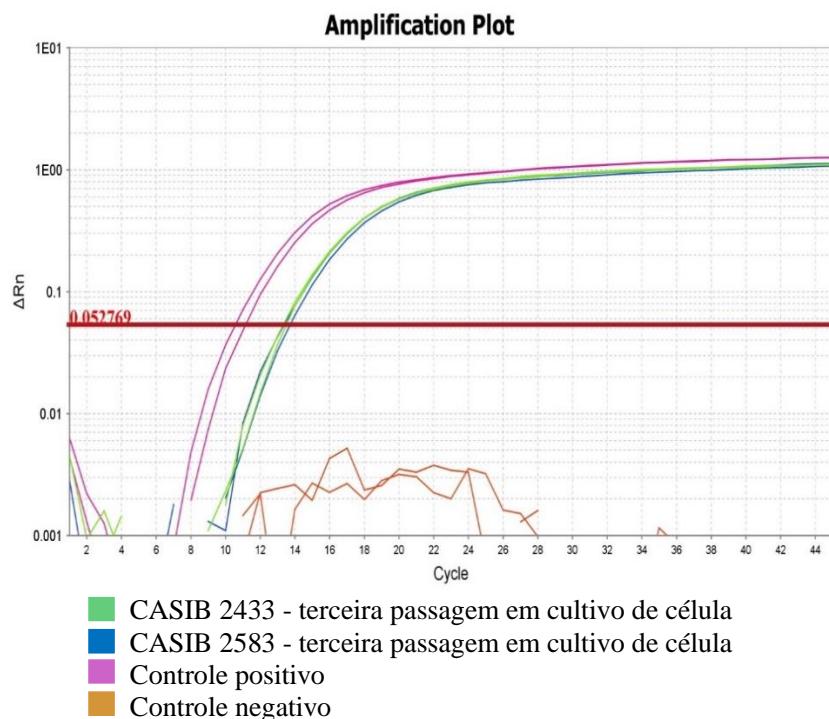


Figura 7- Imagem do Gráfico gerado pelo software mostrando a curva de dissociação no teste de RT-PCR das amostras de tecido provenientes dos animais identificados como CASIB 2433 e CASIB 2583.



## 6 DISCUSSÃO

Ainda não são utilizados com frequência no Brasil, exames de diagnósticos precisos para identificar os agentes virais das doenças hemorrágicas dos cervídeos. Há anos, essas doenças têm sido descritas em animais mantidos em criadouros e zoológicos no país, sendo, portanto, fundamental estudar, identificar e controlar essas enfermidades nas coleções cativas (WERTHER; KAWANAMI, 2014). No Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional nenhum agente viral das doenças hemorrágicas tinha sido identificado até então, porém as perdas esporádicas de cervídeos eram sugestivas de uma doença viral infecciosa de alta mortalidade. Os animais criados no Refúgio são de grande importância para a manutenção da espécie e os programas de reprodução, e os óbitos recorrentes foram motivo de preocupação para a equipe responsável.

O teste sorológico utilizado nesse estudo foi a imunodifusão em gel de ágar, que é um teste indicado pela OIE para o diagnóstico indireto de BTV. O teste de IDGA é o mais utilizado em levantamentos epidemiológicos na detecção de anticorpos contra o BTV. Embora seja um exame simples, barato e rápido, a interpretação dos resultados pode ser difícil, já que a sensibilidade não é alta, não é quantitativo e pode apresentar reações cruzadas com outras orbiviroses, como o EHDV (AFSHAR et al., 1989).

A prevalência de animais soropositivos para BTV no plantel de veados-bororós (*Mazama nana*) do Refúgio Biológico Bela Vista foi baixa (3,12%), indicando que os animais foram pouco expostos ao vírus e/ou que na espécie *Mazama nana* a doença causa alta mortalidade e, portanto, baixa taxa de recuperação e soroconversão e/ou, ainda, que os sorotipos virais do BTV existentes na região são bastante patogênicos para a espécie *M. nana*. Foram relatadas perdas recorrentes de animais com sinais de doenças hemorrágicas no Refúgio Biológico por vários anos, fato descrito por Duarte e Reis (2012) no Plano

Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção. Em um estudo realizado por Duarte (2001) em cervos-d-pantanal de vida livre, nas várzeas do Rio Paraná, a prevalência de animais soropositivos para a LA foi de 88%, enquanto que para a doença epizoótica hemorrágica foi de 74% (x/y), indicando que essa espécie de cervídeo é relativamente resistente à infecção e/ou os sorotipos virais presentes na região eram pouco patogênicos para o cervo-do-pantanal. Em um estudo retrospectivo, Lager (2004) relatou estudos de prevalência de LA em ruminantes domésticos, realizados em oito estados brasileiros, sendo que no estado do Paraíba a soroprevalência foi de 4,82%, Sergipe: 89,69%, Minas Gerais: 76,3% e no Rio de Janeiro a prevalência de anticorpos contra o BTV em bovinos foi de 40,86%, em caprinos 44,08% e em ovinos 24,24%. Em São Paulo foi de 53,73% No estado do Paraná a prevalência encontrada em bovinos foi de 19,81%, Santa Catarina: 37,75% e Rio Grande do Sul: 1,22%. O autor dessa revisão relaciona a variação de prevalência de anticorpos à diferenças de susceptibilidade dos hospedeiros e às variações climáticas entre as regiões, já que essas afetam a distribuição do vetor. Segundo a OIE (2010) a distribuição histórica do BTV nas áreas subtropicais e tropicais estão compreendidas entre as latitudes 50°N e 34°S. A distribuição geográfica da maioria das espécies de insetos sofre influência da temperatura ambiente, sendo que temperaturas baixas tendem a ser mais significantes que altas temperaturas na determinação da distribuição das espécies. Como o aumento da temperatura leva a um aumento da frequência alimentar do vetor, isto se torna relevante na epidemiologia da transmissão do vírus (Wittmann; Baylis, 2000). O clima de Foz do Iguaçu é subtropical úmido, sendo que no período de inverno a temperatura se mantém em média aos 13°C, enquanto no verão as temperaturas podem ultrapassar 30°C. As condições climáticas e geográficas são, portanto, favoráveis à existência do vetor do BTV e à consequente transmissão da doença. Contudo, são necessárias investigações

para a identificação dos vetores da BTV envolvidos no ciclo epidemiológico da doença na região.

A baixa prevalência de anticorpos contra BTV encontrada nesse estudo pode estar relacionada a alta mortalidade provavelmente decorrente da grande susceptibilidade da espécie ao desenvolvimento da doença. Em um estudo realizado por Tomich et al. (2009), nos anos de 2002 e 2003, no pantanal sul-mato-grossense, observou-se um percentual de soropositividade de 42% em bovinos (92/219), 10,9% em ovinos (6/55) e 0% em veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) (0/49). O autor atribui essa diferença a possível preferência do vetor por uma determinada espécie de hospedeiro. Várias espécies de *Culicoides* de comprovada competência na transmissão do BTV alimentam-se preferencialmente em bovinos (Lobato, 1999).

Padolfi (1999) coletou amostras de soro de 217 animais da fazenda experimental da Unesp em Jaboticabal-SP, sendo 75 bovinos, 62 ovinos, 58 caprinos, e 22 cervídeos. Nesse estudo foram utilizados dois métodos Competitivos de ELISA para a determinação da prevalência de anticorpos contra a LA. Como um todo, o rebanho apresentou 69% de positividade. Quando analisadas as soroprevalências de cada espécie de ruminante separadamente, o autor observou 97% de soropositividade para LA nos bovinos, 87% nos ovinos e 37% nos caprinos. Dente os cervídeos avaliados (veados-bororó, veado-campeiro e veado-catingueiro) no estudo citado, cinco animais (22%) apresentaram anticorpos contra o BTV. Assim como no estudo de Tomich et al. (2009) a prevalência de anticorpos em cervídeos foi menor do que em ruminantes domésticos. Além da preferência do vetor por uma determinada espécie de hospedeiro, a maior susceptibilidade dos cervídeos em desenvolver a doença clínica e fatal pode estar relacionada com a baixa soroprevalência contra BTV.

Dentre os materiais coletados dos quatro animais que vieram a óbito com sinais de doença, quatro tiveram resultado

positivo para BTV no teste de RT-PCR em tempo real, indicando a presença do material genético viral nos tecidos e sangue dos animais. Os quatro animais positivos eram adultos jovens e nascidos no Refúgio. As amostras positivas para RTq-PCR em tempo real passaram por cultivo celular para isolamento, sendo que foram isolados ao todo três sorotipos de BTV. Em um estudo realizado por Kawanami (2012), utilizando amostras de tecidos parafinizados provenientes de 42 cervídeos que foram necropsiados e apresentaram sinais clínicos e lesões sugestivos de doença hemorrágica, foi obtido um total de três resultados positivos (7,14%) para a técnica de RT-PCR para BTV, sendo que outras quatro amostras apresentaram Ct elevado na PCR convencional todas as sete amostras obtiveram resultado positivo. A autora atribui a grande quantidade de resultados negativos à fixação do material em formalina, que variou de dias a meses, e o tempo de arquivamento em blocos de parafina. Ainda, segundo Kawanami (2012), o sequenciamento e a identificação dos sorotipos não foi possível provavelmente pela fragmentação do material genômico devido à fixação em formalina e ao tempo de armazenamento da amostra. No presente estudo, o uso de material congelado e mais recente se mostrou mais favorável à preservação do vírus e, consequentemente, seu isolamento e sorotipificação. Portanto, recomenda-se que as instituições que mantém cervídeos, coletem fragmentos de tecidos e mantenha-os congelados para futura investigação.

O primeiro isolamento do BTV em animais infectados naturalmente na América do Sul foi proveniente de gado bovino importado do Brasil para os EUA (LARGER, 2004). Esse fato ocorreu em 1980, e o vírus isolado foi o do sorotipo 4, até então inexistente nos EUA (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982). Em abril de 2001 foi isolado o sorotipo 12 em ovinos e caprinos de uma propriedade em Curitiba (PR). Essa propriedade mantinha rebanho misto de ovinos, caprinos e bovinos, e ruminantes silvestres tinham sido observados na região. Ao todo, 21 animais

apresentaram sinais clínicos da doença, porém apenas duas ovelhas e uma cabra morreram em decorrência da infecção (CLAVIJO et al. 2002).

Em 2009 ocorreram dois surtos de BTV no Rio Grande do Sul, no primeiro 14 ovinos apresentaram sinais clínicos da doença, desses, 8 animais vieram a óbito. Na segunda fazenda 1 animal macho apresentou os sinais clínicos da doença. O sorotipo 12 foi identificado utilizando a técnica de RT-PCR e sequenciamento (ANTONIASSI et al. 2010).

Em 2013 ocorreram mortes de ovelhas com sinais e lesões compatíveis com a doença no estado do Rio de Janeiro. O BTV- 4 foi identificados por testes moleculares (BALARO et al. 2014).

Na Argentina, o vírus foi isolado do sangue de bovino sem sinais clínicos, e foi identificado como pertencente ao sorotipo 4 (GORSCH et al., 2002).

Viarouge et al. (2014) isolou 8 sorotipos de BTV provenientes de amostras de ruminantes domésticos na Guiana Francesa. Os sorotipos 1, 2, 10, 12, 13, 17 e 24 foram isolados de bovinos jovens sem sinais clínicos. Os sorotipos 2, 6 12, 24 foram identificados em amostras de animais importados da França, e os sorotipos 2, 13 e 17 foram isolados de ovinos e caprinos que apresentavam sinais clínicos da doença.

Existem poucos relatos de isolamentos do vírus da língua azul em ruminantes silvestres. Segundo Johnson et al.,(2006) em 2004 ocorreu o primeiro isolamento de BTV-1 do material coletado de um veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos. O animal foi morto por um caçador no estado de Luisiana. Na Espanha em 2007, foi realizado o isolamento BTV-1 de muflon que apresentavam sinais clínicos como congestão, edema e hemorragias (FERNÁNDEZ-PACHECO et al. 2008).

Os sorotipos de BTV, encontrados no presente trabalho foram o 3, 18 e 14. Segundo Lager (2004) os sorotipos de língua azul identificados no Brasil são 4, 6, 14, 17, 19 e 20, porém esses

resultados são considerados preliminares, pois foram obtidos de técnicas sorológicas, podendo haver reação cruzada entre sorotipos. Como já citado, os sorotipos identificados por isolamento no Brasil são o BTV-4 e BTV-12. Esses dois são os únicos sorotipos cujo isolamento foi publicado no país até o momento. Portanto, é a primeira vez que os sorotipos identificados no presente estudo são isolados no país.

Os sorotipos 3 e 18 já foram isolados de ruminantes domésticos na Índia, país no qual já foram identificados, ao todo, 18 sorotipos de BTV (PRASAD; JAIN; GUPTA, 1992; KULKARNI, KULKARNI, 1984). Além da Índia o BTV-3 já foi isolado na Oceania, América Central, e Estados Unidos. O sorotipo 14 também foi isolado nos EUA. (BHANUPRAKASH et al., 2009).

A identificação dos sorotipos de BTV é um dado importante, não só porque acrescenta informações sobre quais os tipos que ocorrem no Brasil, mas também porque com base nos sorotipos é possível o desenvolvimento de uma vacina, que pode diminuir a morbidade e mortalidade de animais no plantel estudado.

Os achados macroscópicos mais significativos das necropsias dos animais positivos para BTV foram: petéquias em língua (2/4), petéquias e sufusões em compartimentos do estômago (3/4), conteúdo sanguinolento no intestino (3/4), pulmão hemorrágico (4/4), sufusões e petéquias em miocárdio (4/4) e rins hemorrágicos (4/4). Todas as lesões já foram citadas em literatura. As principais alterações macroscópicas encontradas por Kawanami (2012) nos sete animais positivos para BTV foram conteúdo intestinal hemorrágico (85,71%, n=6), petéquias (57,14%, n=4) em língua e coração, mucosas avermelhadas do trato gastrointestinal (42,86%, n=3) e úlcera em língua (42,86%, n=2).

Todas as amostras de sangue e tecido utilizadas nesse estudo foram negativas para EHDV no teste RT-PCR. Sendo assim, conclui-se que nenhum animal apresentava-se virêmico

no momento da colheita de sangue, e que não foi achado material genético viral no tecido dos animais mortos. Isso pode ser devido ao fato de que os animais do Refúgio Biológico Bela Vista não estejam sendo infectados com o vírus da doença epizoótica hemorrágica, ou então, não estão desenvolvendo a doença. Assim como no presente estudo, o trabalho de Kawanami (2012), realizado com animais provenientes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos em Jaboticabal-SP, todas as amostras de tecido foram negativas para EHDV, utilizando-se a técnica de RT-PCR. A autora atribuiu esse resultado a ausência do vírus nas amostras estudadas ou à degradação do material genético viral causada pela fixação em formalina.

Em 2008, o EHDV foi isolado de dois animais pertencentes a espécie *Mazama gouazoubira* (1 fêmea de 2 anos de idade) e *Mazama nana* (1 macho de 1 ano de idade) pertencente ao Zoológico de Pomerode-SC. Os animais apresentavam sinais clínicos e lesões compatíveis com doenças hemorrágiacas (FAVERO et al., 2013). Este foi o primeiro isolamento do vírus no Brasil, ainda que testes sorológicos já indicassem sua presença no país. Pandolfi (1999) encontrou 39% dos animais soropositivos para EHDV, e a análise individualizada por espécie mostrou positividade para 88% dos bovinos, 24% dos ovinos e 2% dos caprinos. Quanto aos cervídeos, apenas 9% apresentaram positividade. A pesquisa de EHDV no Brasil é recente e ainda existem poucos dados sobre a distribuição do vírus no país.

Quanto aos testes de PCR para adenovírus dos cervídeos, todos os resultados no presente estudo foram negativos, não sendo possível encontrar indícios de material genético viral nas amostras. O primeiro relato de infecção por OdAdV-1 foi de um surto ocorrido na Califórnia em 1993, que levou no mínimo mil animais da espécie *Odocoileus hemionius* ao óbito e atingiu 17 províncias (WOODS et al. 1996). Depois desse surto, o vírus foi identificado como causador de doença hemorrágica em diversos cervídeos na América do Norte (KAWANAMI, 2012).

No Brasil, o único estudo realizado com adenovírus de cervídeos foi o de Kawanami (2012), que utilizou 42 amostras de cervídeos que vieram a óbito com sinais de doença hemorrágica. O material foi testado para DHA pela técnica de imunohistoquímica e todos os resultados foram negativos.

A ausência de resultados positivos para adenovírus nas amostras de cervídeos no Brasil pode ser decorrente de resistência das espécies brasileiras ao vírus ou a ausência do vírus no território nacional. Sugere-se mais estudos sobre o OdAdV-1 no Brasil, incluindo estudos sorológicos.

## 7 CONCLUSÃO

Com esse trabalho foi possível identificar que o vírus causador da doença hemorrágica que acometeu os animais do Refúgio Biológico Bela Vista durante o ano de 2014 é o vírus da língua azul. A prevalência de anticorpos contra o BTV no plantel de veados-bororós-do-sul foi de 3,12%. Constatou-se a presença de três novos sorotipos de BTV no Brasil, o BTV-3, BTV-14 e BTV-18. Esses dados sugerem que o agente causador da doença da língua azul está muito mais disseminado no país do que o que se imaginava anteriormente, e que a região de Foz do Iguaçu – PR apresenta as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do vetor da doença.

No presente estudo não houve resultados que indicassem a presença do EHDV ou do adenovírus de cervídeos, todas as amostras testadas foram negativas para essas duas doenças.

A identificação do BTV como o agente causador da doença com alta mortalidade no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional leva ao questionamento do quanto os agentes causadores de doenças de animais domésticos são perigosos para populações de animais silvestres que cada vez mais sofrem com a perda de seu habitat e são levados a se aproximar de áreas habitadas por seres humanos e consequentemente por seus animais doméstico. Se torna notável a necessidade de novos estudos sobre os impactos da LA em populações de ruminantes silvestres de vida livre.

## REFERÊNCIAS

- ABRIL, V.V.; VOGLIOTTI, A.; VARELA, D.M.; DUARTE, J.M.B.; CARTES. J.L. Brasilian Dwarf Brocket Deer. *Mazama nana* (Hensel 1872). In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of American Deer.** Jaboticabal: FUNEP, 2010.p.160-165.
- ABRIL, V.V.; DUARTE, J.M.B. 2008. *Mazama nana*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on **11 May 2015**.
- AFSHAR, A.; THOMAS, F. C.; WRIGHT, P. F.; SHAPIRO, J. L. ALDERSON, J. Comparasion of competitive ELISE, indirect ELISA and standart AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. **The Veterinary Record**, v. 11, p. 136-141, 1989.
- ALFIERI, A. A.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z. I. P. Reoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p. 809 – 838.
- ALSHAIKHAHMED, K.; ROY, P. Generation of virus-like particles for emerging epizootic haemorrhagic disease virus: Towards the developmentof safe vaccine candidates. **Vaccine**. No prelo.
- ANTONIASSI, N.A.B.; PAVARINI, S. P.; RIBEIRO, L. A. O.; SILVA, M. FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 12, p. 1010 – 1016, 2010.
- ARIDA, G. M. M.; MORATO, R. G.; DUARTE, J. M. B. Língua Azul e/ ou Doença Epizoótica Hemorrágica. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e Conservação de Cervídeos**

**Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama*.**

Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 214-224.

BALARO, M.F.A.; LIMA, M.S.; DEL FAVA, C.; OLIVEIRA, G.R.; PITUCO, E.M.; BRANDÃO, F.Z. Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 26, 567-570, 2014

BHANUPRAKASH, V.; INDRANI, B. K.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; SINGH, R. K. Bluetongue vaccine: the past, present and future. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 191-204, 2009.

BOWEN, R. A.; HOWARD, T. H.; ENTWISTLE, K. W.; PICKETT, B.W. Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected mature bulls. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, 2268, 1983.

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

**Center for Food Security and Public Health.** Animal Disease Information 2006. Epizootic Hemorrhagic Disease, Hemorrhagic Disease, Ibaraki Disease. Disponível em: <[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epizootic\\_hemorrhagic\\_disease.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epizootic_hemorrhagic_disease.pdf)> Acesso em: 25.mai.2015.

CÊTRE-SOSSAH, C.; ROGER, M.; SAILLEAU, C.; RIEAU, L.; ZIENTARA, S.; BRÉARD, E.; VIAROUGE, C.; BERAL, M.; ESNAULT, O.; CARDINALE, E. Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: Evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 383-390, 2014.

CHATZOPOULOS, D. C.; VALIAKOS, G.;  
GIANNAKOPOULOS, A.; BIRTSAS, P.; SOKOS, C.;  
VASILEIOUA, N.G.C.; PAPASPYROPOULOS, K.;  
TSOKANAA, C.N.; SPYROUB, V.; FTHENAKIS, G.C.;  
BILLINIS, C. Bluetongue Virus in wild ruminants in Europe:  
Concerns and facts, with a brief reference to bluetongue in  
cervids in Greece during the 2014 outbreak. **Small Ruminant  
Research**, v.128, p.79-87, 2015.

DROLET, B.S.; REISTER, L. M.; RIGG, T. D.; NOL, P.; ,  
PODELL, B. K.; , MECHAM, J. O.; VERCAUTEREN, K. C.;  
VAN RIJN, P. A.; WILSON, W.C.; BOWEN, R. A.  
Experimental infection of white-tailed deer (*Odocoileus  
virginianus*) with Northern European bluetongue virus serotype  
8. **Veterinary Microbiology**, v.166, p. 347-355, 2013.

DUARTE, J.M.B. **Guia de identificação de cervídeos  
brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, 1996.

DUARTE, J.M.B.; MERINO, M. L.; GONZALEZ, S.;  
NUNES, A. L. V.; GARCIA, J. M. SZABÓ, M. P. J.;  
PANDOLFI, J.R.; ARANTES, I. G.; NASCIMENTO, A. A;  
ZACARIAS, R.; MACHADO, R. Z; ARAÚJO JR., J. P.;  
CATÃO-DIAS, J. L.; WERTHER, K.; GARCIA, J. E.; GIRIO,  
R. J. S.; MATUSHIMA, E.R. Order Artiodactyla, Family  
Cervidae (Deer). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology,  
Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**.  
Iwoa: Iowa State University Press, 2001. p.402-422.

DUARTE, J. M. B. O cervo-do-pantanal (*Blastocerus  
dichotomus*) de Porto Primavera. Resultado de dois anos de  
Pesquisa. CD ROM. FUNEP, Jaboticabal, São Paulo, 2001.

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

DUARTE, J. M. B. Artiodactyla – Cervidae (Veados e Cervos). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Medicina de Animais Selvagens**. 2 ed. São Paulo: ROCA, 2014.

DUARTE, J. M. B.; ABRIL, V. V.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E. S.; OLIVEIRA, M. L.; TIEPOLO, L.M.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do Risco de Extinção do Veado-cambuta *Mazama nana* Hensel, 1872, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, Ano II, nº 3, p.59-68, 2012.

DUARTE, J. M. B.; REIS, M. L. Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção. **Embrapa Pantanal-Livros científicos (ALICE)**, 2012.

FAVERO, C.M.; MATOS, A. C. D.; CAMPOS, F. S.; CÂNDIDO, M. V.; COSTA, E.A.; HEINEMANN, M. B.; FIGUEIREDO, E.; STANCIOLI, B.; LOBATO, Z. I. P. Epizootic Hemorrhagic Disease in Brocket Deer, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 19, n. 2, Fev. 2013.

FERNÁNDEZ-PACHECO, P., FERNÁNDEZ-PINERO, J., AGÜERO, M., JIMÉNEZ-CLAVERO, M. A. Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain. **Veterinary Record**, v.162, p. 659-660, 2008.

FISCHER, J. R.; HANSEN, L.P.; 2 JAMES R. TURK, J. R.; MILLER, M. A.; FALES, W. H.; GOSSER, H. S. Epizootic Of

Hemorrhagic Disease In White-Tailed Deer (*Odocoileus Virginianus*) In Missouri: Necropsy Findings And Population Impact. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n.1, p. 30-36, 1995.

Gasparini, R.L.; Duarte, J. M. B.; Nunes, A. L. V. Manejo em Cativeiro. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1997.p. 126-137.

GIBBS, E. P. J.; GREINER, E. C. The Epidemiology of Bluetongue. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.17, n.3/4 p. 207-220, 1994.

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 identification of vectors in northeastern Argentina. **Revista Argentina de microbiología**, v.34, n.3, p 150-156, 2002.

GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an Exotic Serotype of Bluetongue Virus from Imported Cattle in Quarantine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, n. 2, p. 160, 1982.

HOFMANN, M.; GRIOT, C.; CHAIGNAT, V.; PERLER, L.; THÜR, B. Blauzungunkrankheit erreicht die Schweiz. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v.150, n. 2, p. 49-56, 2008.

HOWARD, T. H.; BOWEN R. A.; PICKETT, B.W. Isolation of bluetongue virus from semen. **Progress in Clinical and Biological Research**, Nova York, v. 178, n. 127, 1984.

ITAIPU BINACIONAL. **Clima.** Disponível em:  
<<https://www.itaipu.gov.br/turismo/clima>> acesso em: 30 de dez de 2015.

JOHNSON, D. J.; OSTLUND, E. N.; STALLKNECHT, D. E.; GOEKJIAN, V. H.; JENKINS-MOORE, M.; HARRIS, S. C. First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 18, p. 398-401, 2006.

KAWANAMI, A. E. **Pesquisa de agentes virais de doenças hemorrágicas em cervídeos brasileiros: estudo retrospectivo.** 2012. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – patologia veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal. 2012.

KULKARNI, D.D.; KULKARNI, M.N., (1984). Isolation of bluelongue virus from sheep. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v.5, p.125, 1984.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v. 40, n.2, p. 89-93, 2004.

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

LAPOINTE, J. M.; HEDGES, J. F.; WOODS, L. W.; REUBEL, G. H.; MACLACHLAN, N. J. The adenovirus that causes hemorrhagic disease of black-tailed deer is closely related to bovine adenovirus-3. **Archives of Virology**, v. 144, p. 393-396, 1999.

MAAN, N.S.; MAAN, S.; BELAGANAHAALLI, M.N; PULLINGER, G .; MONTES, A. J. A.; Gasparini, M. R.; GuimerA, M.; OSTLUND, E.N.; JOHNSON, D.J.; NOMIKOU, K.; MERTENS, P.P.C. A quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) assay to detect genome segment 9 of all 26 bluetongue virus serotypes. **Journal of Virological Methods**, v. 213, p. 118-126, 2015.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. Adenoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. 413-432.

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. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.178, p.201-206, 1985.

MURPHY, M.D.; HOWERTH, E.W.; MACLACHLAN, N.J.; STALLKNECHT, D.E. Genetic variation among epizootic hemorrhagic disease viruses in the southeastern United States: 1978-2001. **Infection Genetics and Evolution**. vol. 5, n.2, p.157-65. 2005.

OIE. **Office International des Épizooties**. OIE Terrestrial Manual 2014. Bluetongue. Disponível em:  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.03\\_BLUETONGUE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf).> Acesso em 10. nov. 2015

OIE. **Office International des Épizooties**. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2010. Disponível em:  
[http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_1.8.3.htm](http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.8.3.htm)

OIE. **Office International des Épizooties**. OIE Terrestrial Manual 2009. Epizootic Haemorrhagic Disease. Disponível

em:<[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/EPIZOOTIC\\_HEAMORRHAGIC\\_DISEASE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/EPIZOOTIC_HEAMORRHAGIC_DISEASE.pdf)>. Acesso em: 25.mai.2015.

**OIE. Office International des Épizooties.** OIE Terrestrial Manual 2014. Epizootic Haemorrhagic Disease. Disponível em <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.01.04b\\_EHD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.04b_EHD.pdf)>

ORR`U, G; FERRANDO, M.L.; MELONI, M.; LICIARDI, M.; SAVINI, G.; SANTIS, P. D. Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTv) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 137, p. 34-42, 2006.

**PANDOLFI, J. R. C. Língua Azul e Doença Epizoótica Hemorrágica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres.** 1999. 68p. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – patologia veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal. 1999.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama.** Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 60-67.

PRASAD, G.; JAIN, N. C.; GUPTA, Y. Bluetongue virus infection in India: a review. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 11, n. 3, p. 699-711, 1992.

ROEDER, P. L.; TAYLOR, W. P.; ROBERTS, D. H.; WOOD, L.; JEGGO, M. H.; GARD, G. P.; CORTEYN, M.; GRAHAM, S. Failure to establish congenital bluetongue virus infection by infecting cows in early pregnancy. **The Veterinary Record**, v.128, n.13. p. 301-304, 1991.

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.

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.

STOTT, J. L. Reoviridae. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A. 2003. p. 400-407.

TEMIZEL, E. M.; YESILBAG, K.; BATTEN, C.; SENTURK, S., MAAN, N. S.; MERTENS, P. P. C.; BATMAZ, H. Epizootic Hemorrhagic Disease in Cattle, Western Turkey. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.2, p. 317-319, 2009.

TOMICH, R.G.P.; NOGUEIRA, M.F.; LACERDA, A.C.R.; CAMPOS F.S.; TOMAS, W.M.; HERRERA, H.M.; LIMA-BORGES, P.A.; PELLEGRIN, A.O.; LOBATO, Z.I.P.; SILVA, R.A.M.S.; PELLEGRIN, L.A.; BARBOSA-STANCIOLI E.F. Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e veados campeiros no Pantanal sul-mato-grossense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1222-1226, 2009.

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

WALTON, T. E. The history of bluetongue and a current global overview. **Veterinaria Italiana**, v.40, n. 3, p. 31-38, 2004.

WERTHER, K.; KAWANAMI, A. E. Doenças Hemorrágicas em Cervídeos In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Medicina de Animais Selvagens**. 2 ed. São Paulo: ROCA, 2014. p. 1282-1286.

WITTMANN, E. J.; BAYLIS, M. Climate Change: Effects on *Culicoides*-Transmitted Viruses and Implications for the UK. **The Veterinary Journal**. v. 160, p. 107-117, 2000.

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.

## APÊNDICES

Quadro 1- Dados obtidos na anamnese dos exemplares de *Mazama nana* do Refúgio Biológico Bela Vista (RBBV), durante a contenção.

Identificação	Microchip	Brinco	Idade	Origem
CASIB 2569	963008000141671	24	11 meses	RBBV
CASIB 2534	963008000141027	25	2 anos	RBBV
CASIB 2433	985121005536315	56	5 anos	RBBV
CASIB 1929	00061C315A	31	14 anos	NUPECCE
CASIB 2490	985121004940091	61	3 anos	RBBV
CASIB 2329	000621D9E8	99	10 anos	RBBV
CASIB 2555	963008000141541	23	1 ano	RBBV
CASIB 2493	985121006907240	60	3 anos	RBBV
CASIB 2390	000629A76	32	7 anos	RBBV
CASIB 2544	963008000141032	92	2 anos	RBBV
CASIB 2483	963008000141047	---	3 anos	PNI-Realeza
CASIB 2153	0006109F9F	82	11 anos	RBBV
CASIB 2522	963008000141040	71	2 anos	RBBV
CASIB 2503	9851210047901126	72	3 anos	RBBV
ZOO 0469	963008000141581	22	1 mês	RBBV
CASIB 2440	98512100693191	09	4 anos	RBBV
CASIB 2582	963008000141614	20	4 meses	RBBV
ZOO 0456	963008000141600	19	4 meses	RBBV
CASIB 2543	963008000141050	91	2 anos	RBBV
CASIB 2396	00-0621-AE15	----	8 anos	RBBV
CASIB 2533	963008000141026	03	2 anos	RBBV
ZOO 0458	963008000141586	04	3 meses	RBBV
ZOO 0463	963008000141584	02	3 meses	RBBV
ZOO 0465	96300800014158	21	2 meses	RBBV
CASIB 2446	985121006916670	11	4 anos	RBBV
CASIB 2410	963008000141596	12	6 anos	RBBV
CASIB 2547	963008000141680	06	2 anos	RBBV
CASIB 2581	963008000141617	05	4 meses	RBBV
CASIB 2531	983008000141028	64	2 anos	RBBV
ZOO 0061	00-061C-0E77	13	15 anos	RBBV
CASIB 2451	985121005346666	54	4 anos	RBBV
CASIB 2583	963008000141606	---	4 meses	RBBV

Quadro 2- Parâmetros obtidos durante o exame físico dos exemplares de *Mazama nana* submetidos a contenção química com cetamina (7mg/kg) e demetomidina (100mg/kg) para coleta de amostras de sangue.

Identificação	Peso (kg)	Temperatura retal (°C)	Pelame	Escore corporal (1-5)	Sexo
CASIB 2569	9,5 kg	38,7	Brilhante	3	Macho
CASIB 2534	14,8	38,6	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2433	14,6	38,7	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 1929	14,54	39,4	Brilhante	3	Macho
CASIB 2490	16,38	32,2	Brilhante	3	Macho
CASIB 2329	14,4	38,6	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2555	12,9	39,4	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2493	15,7	39,6	Brilhante	3,5	Fêmea
CASIB 2390	15,1	38,9	Brilhante	3,5	Fêmea
CASIB 2544	12	39,2	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2483	11,8	41,3	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2153	14,78	38,8	Brilhante	3	Macho
CASIB 2522	14,82	39,3	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2503	14,34	38,3	Brilhante	3	Fêmea
ZOO 0469	3,68	38,2	Brilhante	2,5	Fêmea
CASIB 2440	14,38	38,9	Brilhante	2,5	Fêmea
CASIB 2582	8	39,1	Brilhante	3	Macho
ZOO 0456	7,2	38,8	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2543	15,16	38,7	Brilhante	3,5	Macho
CASIB 2396	14	39,5	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2533	13,74	40,6	Brilhante	3	Fêmea
ZOO 0458	6	40,1	Brilhante	3	Fêmea
ZOO 0463	6,46	39,8	Brilhante	3	Fêmea
ZOO 0465	8	39,1	Brilhante	3	Macho
CASIB 2446	14	41,4	Brilhante	3	Macho
CASIB 2410	18	41	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2547	12,2	40	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2581	8,75	38,7	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2531	11,7	37,3	Brilhante	2,5	Macho
ZOO 0061	14,2	40,3	Brilhante	3	Macho
CASIB 2451	14,28	38,3	Brilhante	3	Fêmea
CASIB 2583	8	39,4	Brilhante	3	Fêmea

Fonte: Arquivo pessoal

## ANEXOS

**ANEXO A – Fichas de necropsias dos animais dos quais foi isolado o vírus da língua azul.**

 <b>ITAIPU</b> BINACIONAL	
<b>NOME COMUM:</b> VEADO BORORÓ <b>NOME CIENTÍFICO:</b> MAZAMA NANA <b>ORDEM/ FAMÍLIA:</b> ARTIODACTYLA <b>APELIDO:</b> SEM <b>IDENTIFICAÇÃO:</b> 963008000141027 <b>ORIGEM:</b> Casib <b>MORTE:</b> DURANTE O TRATAMENTO <b>DESTINO:</b> Resíduo hospitalar	<b>Nº NECROPSIA:</b> 2485 <b>Nº ANIMAL:</b> CASIB 2534 <b>Nº ATESTADO:</b> <b>SEXO:</b> Fêmea <b>IDADE:</b> 2 ANOS <b>PESO:</b> 14,8 <b>DATA ÓBITO:</b> 11/03/15 <b>DATA NECROPSIA:</b> 11/03/15
<b>HISTÓRICO:</b> ANIMAL FOI ENCAMINHADO AO HOSPITAL NO DIA 11/03 COM EDEMA SUBMANDIBULAR E SANGRAMENTO NA REGIÃO DO ANUS E INCOORDENAÇÃO. AO CHEGAR NO HOSPITAL FOI SEDADO COM ISOFLURANO. NÃO FOI POSSÍVEL CANULAR OU COLETAR SANGUE DO ANIMAL, QUE VEIO A ÓBITO EM SEGUIDA.	
<b>DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:</b> <u>EXAME EXTERNO:</u> ESCORE CORPORAL BOM (GRAU 3), PRESENÇA DE SANGUE VIVO NA REGIÃO DO ANUS; EDEMA SUBMANDIBULAR E SUBLINGUAL. <u>EXAME INTERNO:</u> MÚSCULATURA: NADA DIGNO DE NOTA. CAVIDADE ABDOMINAL: PRESENÇA DE SANGUE LIVRE. SISTEMA DIGESTÓRIO: CAVIDADE ORAL: LÍNGUA PARA FORA DA BOCA DO ANIMAL, EDEMA SUBLINGUAL. ESÓFAGO: SEM CONTEÚDO. RÚMEN, OMAZO, ABOMASO E RETÍCULO: SEM ALTERAÇÕES, PRESENÇA DE POUCO CONTEÚDO DE COLORAÇÃO ESVERDEADA. <u>INTESTINO DELGADO:</u> DUODENO E JEJUNO COM COLORAÇÃO MUITO ESCURA, QUASE NEGRO, AO CORTE PRESENÇA DE ABUNDANTE CONTEÚDO SANGUINOLVENTO. <u>INTESTINO GROSSO:</u> CONTEÚDO SANGUINOLVENTO NO LÚMEN. <u>FIGADO:</u> CONGESTO COM SANGUE AO CORTE. SISTEMA RESPIRATÓRIO: TRAQUEIA: PEQUENA QUANTIDADE DE ESPUMA. PULMÃO: CONGESTO, COM CONTEÚDO ESPUMOSO NO INTERIOR (EDEMA). <u>CORAÇÃO:</u> ÁREAS HEMORRÁGICAS NO EPICÁRDIO DO VENTRÍCULO ESQUERDO. <u>BACO:</u> COLORAÇÃO ESCURA. <u>SISTEMA URINÁRIO:</u> RINS: HEMORRÁGICOS COM COLORAÇÃO VERMELHA ESCURA. AO CORTE A CORTICAL E MEDULAR COM COLORAÇÃO VERMELHA. <u>ACHADOS/ COMENTÁRIOS:</u> CAVIDADE ABDOMINAL: SANGUE LIVRE. CABEÇA: EDEMA SUBMANDIBULAR E SUBLINGUAL <u>INTESTINO:</u> CONTEÚDO HEMORRÁGICO <u>PULMÃO:</u> CONGESTÃO E ESPUMA (EDEMA) <u>RINS:</u> COLORAÇÃO VERMELHA ESCURA (HEMORRAGIA) <u>CORAÇÃO</u> ÁREAS HEMORRÁGICAS. <u>CAUSA MORTIS:</u> CHOQUE HIPOVOLÉMICO DECORRENTE DE HEMORRAGIA GENERALIZADA. (DOENÇA HEMORRÁGICA)	
<b>CÓDIGO:</b> <u>HISTOPATOLOGIA:</u> SIM <u>OUTROS EXAMES:</u> PCR – LÍNGUA AZUL, ISOLAMENTO VIRAL POSITIVO <u>IMAGENS:</u>	
<b>MÉDICO VETERINÁRIO:</b> Dr. Zalmir Silvino Cubas MARIA HELENA MAZZONI BALDINI (MESTRANDA UDESC)	

<b>NOME COMUM:</b> VEADO BORORÓ <b>NOME CIENTÍFICO:</b> MAZAMA NANA <b>ORDEM/ FAMÍLIA:</b> ARTYCOACTYLA <b>APELIDO:</b> SEM <b>IDENTIFICAÇÃO:</b> MICROCHIP 963008000141606 <b>ORIGEM:</b> CASIB <b>MORTE:</b> DURANTE O TRATAMENTO <b>DESTINO:</b> RESÍDUO HOSPITALAR		<b>Nº NECROPSIA:</b> 2502 <b>Nº ANIMAL:</b> CASIB 2583 <b>Nº ATESTADO:</b> 24/15 <b>SEXO:</b> FÊMEA <b>IDADE:</b> ADULTO <b>PESO:</b> 8,8 KG <b>DATA ÓBITO:</b> 26/06/2015 <b>DATA NECROPSIA:</b> 26/06/2015
<u><b>HISTÓRICO:</b></u> NO DIA 25/06, PERÍODO DA TARDE, O TRATADOR OBSERVOU SINAIS DE DOENÇA HEMORRÁGICA. NO DIA 26/06 FOI LEVADO AO HV COM SIMPLES CONTENÇÃO FÍSICA.		
<u><b>DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:</b></u> <b>EXAME EXTERNO:</b> ESTADO NUTRICIONAL NORMAL, SANGUE EM ESCLERA, DIARRÉIA SANGUINOLENTA E EDEMA SUBMANDIBULAR. <b>EXAME INTERNO:</b> LÍQUIDO AMARELADO NO ESPAÇO SUBCUTÂNEO, PRÓXIMO A ESCÁPULA. <b>SISTEMA DIGESTÓRIO:</b> CAVIDADE ORAL COM SANGUE, PETÉQUIAS NA LÍNGUA; ESÓFAGO COM ASPECTO E COLORAÇÃO NORMAIS E SEM CONTEÚDO ALIMENTAR; <u>ESTÔMAGOS</u> , SEROSAS HEMORRÁGICAS, PETÉQUIAS E SUPUSÕES DIFUSAS POR TODO O RÚMEN, RETÍCULO, OMASO E ABOMASO, MUCOSAS NORMAIS E COM CONTEÚDO ALIMENTAR. INTESTINOS COM INGESTA, UM SEGMENTO APRESENTAVA-SE HEMORRÁGICO, COM CONTEÚDO E MUCOSA HEMORRÁGICOS; <u>FIGADO</u> DE COR Parda E ASPECTO FRIÁVEL; <b>SISTEMA RESPIRATÓRIO:</b> TRAQUEIA SEM PRESENÇA DE ESPUMA E SANGUE, MAS PEQUENAS PETÉQUIAS HEMORRÁGICAS NA MUCOSA INTERNA; <u>PULMÕES</u> VERMELHOS ESCUROS, CREPITANTES, DE ASPECTO ENFISEMATOSO. <b>SISTEMA CARDIOCIRCULATÓRIO:</b> CORAÇÃO COM Tamanho NORMAL, SUPERFÍCIE DO MIOCÁRDIO COM POUquíSSIMAS PETÉQUIAS. SACO PERICÁRDICO DE ASPECTO E TAMANHOS NORMAIS. <b>SISTEMA LINFÁTICO:</b> BAÇO COM CONSISTÊNCIA NORMAL E TAMANHO NORMAIS. <b>SISTEMA URINÁRIO:</b> RINS COLORAÇÃO VERMELHA HEMORRÁGICA UNIFORME, SEM DIFERENCIACAO DE ÁREA CORTICAL E MEDULAR. <b>REPRODUTOR:</b> ÚTERO E OVÁRIOS REDUZIDOS E COM PETÉQUIAS HEMORRÁGICAS.		
<u><b>ACHADOS/ COMENTÁRIOS:</b></u> PULMÃO, HEMORRÁGICO E ENFISEMATOSO; RINS, HEMORRÁGICOS; SINAIS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS COMPATÍVEIS COM DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL. <b>CAUSA MORTIS:</b> INSUFICIÊNCIA RENAL E RESPIRATÓRIA DECORRENTES DE SÍNDROME HEMORRÁGICA		
<b>CÓDIGO:</b> 004.10.07		
<u><b>HISTOPATOLOGIA:</b></u> COLHIDAS AMOSTRAS DE LINFONODOS, BAÇO, RINS, PÂNCREAS, FIGADO, PULMÃO, CORAÇÃO.		
<u><b>OUTROS EXAMES:</b></u> MICROBIOLÓGICO E AMOSTRAS EM FREEZER PARA ISOLAMENTO VIRAL		
<u><b>IMAGENS:</b></u> 29 IMAGENS 2502 _VEADO BORORÓ		
<b>MÉDICO VETERINÁRIO:</b> WANDERLEI DE MORAES MARZIA ANTONELLI (ESTAGIÁRIA UDESC) STACY WU (ESTAGIÁRIA UDC)		
<b>TERMO DE NECROPSIA</b>		



<b>NOME COMUM:</b> VEADO BORORÓ <b>NOME CIENTÍFICO:</b> MAZAMA NANA <b>ORDEM/ FAMÍLIA:</b> ARTIODACTyla <b>APELIDO:</b> BAMBINA <b>IDENTIFICAÇÃO:</b> MC 985121005536315 <b>ORIGEM:</b> CASIB <b>MORTE:</b> DURANTE O TRATAMENTO <b>DESTINO:</b> RESÍDUO HOSPITALAR		<b>Nº NECROPSIA:</b> 2501 <b>Nº ANIMAL:</b> CASIB 2433 <b>Nº ATESTADO:</b> 23/15 <b>SEXO:</b> FÉMEA <b>IDADE:</b> ADULTO <b>PESO:</b> 12,8 KG <b>DATA ÓBITO:</b> 25/06/2015 <b>DATA NECROPSIA:</b> 26/06/2015
<p><b>HISTÓRICO:</b> O ANIMAL APRESENTOU SINAIS DE DOENÇA (EDEMA DE FACE, ANOREXIA, APATIA) E FOI ENCAMINHADO AO HV POR APRESENTAR SINAIS DE DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL. MORTE AGUDA. INTERNAMENTO NO DIA 25 E MORTE NO DIA 26/06/15.</p> <p><b>DESCRÍÇÃO MACROSCÓPICA:</b></p> <p><b>EXAME EXTERNO:</b> ANIMAL EM ESTADO NUTRICIONAL NORMAL, SANGUE EM ESCLERA, LÍQUIDO NA REGIÃO SUBMANDIBULAR, LINFONODOS POPÚTEOS AUMENTADOS.</p> <p><b>EXAME INTERNO:</b> LÍQUIDO SANGUINOLENTO NA CAVIDADE ABDOMINAL</p> <p><b>SISTEMA DIGESTÓRIO:</b> CAVIDADE ORAL COM SANGUE, PETÉQUIAS NA LÍNGUA AUMENTADA (EDEMACIADA); ESÓFAGO COM ASPECTO E COLORAÇÃO NORMAIS E SEM CONTEÚDO ALIMENTAR; ESTÔMAGOS MUCOSA E SEROSA COM ALGUMAS PETÉQUIAS DIFUSAS, COM CONTEÚDO ALIMENTAR. CONTEÚDO RUMINAL COR VERDE BANDEIRA. ALCAS INTESTINAIS COM COR DIFERENTE CONFORME OS SEGMENTOS (VERDE, PARDO, OCRE E VERMELHO ESCURO), SENDO QUE UM PEQUENO SEGMENTO APRESENTAVA-SE HEMORRÁGICO; FÍGADO COR PARDAS E CONGESTO;</p> <p><b>SISTEMA RESPIRATÓRIO:</b> TRAQUEIA INTEGRA SEM PRESENÇA DE ESPUMA, PORÉM VASOS HIPERÉMICOS E PEQUENA QUANTIDADE DE SANGUE NA PAREDE INTERNA; PULMÕES, HEMORRÁGICOS, CREPITANTES, COM LÍQUIDO E PRESENÇA DE SANGUE AO CORTE.</p> <p><b>SISTEMA CARDÍACO:</b> CORAÇÃO COM TAMANHO NORMAL, SACO PERICÁRDICO COM GRANDE QUANTIDADE DE LÍQUIDO SANGUINOLENTO, PETÉQUIAS E SUFUSÕES NA SUPERFÍCIE CARDÍACA (MIOCÁRDIO), EM GRANDE EXTENSÃO DO ÓRGÃO, AO CORTE PRESENÇA GRANDE QUANTIDADE DE COÁGULOS.</p> <p><b>SISTEMA LINFÁTICO:</b> BAÇO DE ASPECTO RUGOSO, TAMANHO E CONSISTÊNCIA NORMAIS, PORÉM HEMORRÁGICO.</p> <p><b>SISTEMA URINÁRIO:</b> RINS COM GORDURA PERIRRENAL; PERDA DA RELAÇÃO CORTICAL/ MEDULAR, RIM COM COR AVERMELHADA EM TODO O PARÊNQUIMA.</p> <p><b>ACHADOS/ COMENTÁRIOS:</b>  <b>CAUSA MORTIS:</b> HEMORRAGIA INTERNA GENERALIZADA  <b>CÓDIGO:</b> 004.09.04</p> <p><b>HISTOPATOLOGIA:</b> AMOSTRAS DE LINFONODOS, BAÇO, RINS, PÂNCREAS, FÍGADO, PULMÃO, CORAÇÃO.</p> <p><b>OUTROS EXAMES:</b> MICROBIOLÓGICO E AMOSTRAS CONGELADAS PARA ISOLAMENTO VIRAL</p> <p><b>IMAGENS:</b> 55 IMAGENS 2501_VEADO BORORÓ</p>		
<b>MÉDICO VETERINÁRIO:</b> WANDERLEI DE MORAES MARZIA ANTONELLO (ESTAGIÁRIA UDESC) STACY WU (ESTAGIÁRIA UDC)		
<b>TERMO DE NECROPSIA</b>		



<b>NOME COMUM:</b> VEADO BORORÓ <b>NOME CIENTÍFICO:</b> MAZAMA NANA <b>ORDEM/ FAMÍLIA:</b> ARTIODACTyla <b>APELIDO:</b> SEM <b>IDENTIFICAÇÃO:</b> MICROCHIP 985121004940091 <b>ORIGEM:</b> CASIB <b>MORTE:</b> DURANTE O TRATAMENTO <b>DESTINO:</b> RESÍDUO HOSPITALAR	<b>Nº NECROPSIA:</b> 2493 <b>Nº ANIMAL:</b> CASIB 2490/ Zoo 556 <b>Nº ATESTADO:</b> 24/15 <b>SEXO:</b> MACHO <b>IDADE:</b> ADULTO <b>PESO:</b> EM TORNO DE 15 KG <b>DATA ÓBITO:</b> 26/04/2015 <b>DATA NECROPSIA:</b> 27/04/2015
<b>HISTÓRICO:</b> NO DIA 25/04, FOI INTERNADO PARA TRATAMENTO. APRESENTOU QUADRO DE APATIA, DEBILIDADE, EDEMA SUBMANDIBULAR. FOI TRATADO POR DOIS DIAS.	
<b>DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:</b>	
<b>EXAME EXTERNO:</b> EDEMA SUBMANDIBULAR, SANGUE (POUCA QUANTIDADE) EM CAVIDADE ORAL, FEZES SANGUINOLENTA NO ÁNUS, BOM ESTADO NUTRICIONAL (MORTE AGUDA).	
<b>EXAME INTERNO:</b>	
<b>TÓRAX:</b> LÍQUIDO SANGUINOLENTO NA CAVIDADE TORÁCICA (HEMOTÓRAX) EM GRANDE QUANTIDADE (MAIS DE 50 mL); CISTO HIDÁTICO NA CAVIDADE TORÁCICA, PRÓXIMO AO CORAÇÃO.	
<b>SISTEMA RESPIRATÓRIO:</b> TRAQUEIA COM VABOS CONGESTOS, PETÉQUIAS E CONTEÚDO ESPUMOSO CLARO ABUNDANTE; PULMÕES HIPEREMIA UNIFORME E DIFUSA.	
<b>SISTEMA CARDIOCIRCULATORIO:</b> CORAÇÃO, PERICÁRDIO COM VABOS APARENTEIS, CONGESTOS E PETÉQUIAS HEMORRÁGICAS, LÍQUIDO AMARELADO NO SACO PERICÁRDICO, VOLUME MAIOR QUE 20 mL; SUPERFÍCIE DO MIOCÁRDIO COM 8 PETÉQUIAS HEMORRÁGICAS, PRINCIPALMENTE AO LONGO DAS CORONÁRIAS, E EQUIMOSE NO ÁPICE CARDÍACO; ENDOCÁRDIO COM PETÉQUIAS E EQUIMOSSES.	
<b>SISTEMA LINFÁTICO:</b> BADO RUGOSO E COM PETÉQUIAS HEMORRÁGICAS.	
<b>SISTEMA DIGESTÓRIO:</b> ESÓFAGO SEM ALTERAÇÕES EVIDENTES; ESTÔMAGOS, SEROSA DO RÚMEN E DOS OUTROS COMPARTIMENTOS GÁSTRICOS COM PETÉQUIAS, EQUIMOSSES E SUFLUSOES; MUCOSAS HIPERÉMICAS. <u>INTESTINO DELGADO</u> ESCURO E COM CONTEÚDO HEMORRÁGICO; FÍGADO HIPOCOLORADO, COM PETÉQUIAS QUE SE UNEM PARA FORMAR EQUIMOSSES NA FACE VENTRAL E DORSAL DO FÍGADO;	
<b>SISTEMA URINÁRIO:</b> RINS COLORAÇÃO VERMELHA HEMORRÁGICA UNIFORME, COM CÁPSULA ADERIDA; AO CORTE, NÃO HÁ CLARA DIFERENCIACAO ENTRE ZONA CORTICAL E MEDULAR, QUE ESTÃO VERMELHAS.	
<b>ACHADOS COMENTÁRIOS:</b>	
PULMÃO, DIFUSA, HEMORRAGIA E ENFISEMA;	
RINS, SEM DIFERENCIACAO ENTRE ZONAS CORTICAL E MEDULAR; HEMORRAGIA;	
CORAÇÃO, PERICÁRDIO, MIOCÁRDIO E ENDOCÁRDIO; HEMORRAGIA;	
INTESTINO, MUCOSA E CONTEÚDO; HEMORRAGIA;	
ESTÔMAGO, SEROSAS E MUCOSAS, HIPEREMIA E HEMORRAGIA;	
SINAIS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS COMPATÍVEIS COM DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL.	
<b>CAUSA MORTIS:</b> INSUFICIÊNCIA RENAL E RESPIRATÓRIA DECORRENTEIS DE SÍNDROME HEMORRÁGICA	
<b>Código:</b> 004.10.07	
<b>HISTOPATOLÓGIA:</b> COLHIDAS AMOSTRAS PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO	
<b>OUTROS EXAMES:</b> AMOSTRAS EM FREEZER PARA ISOLAMENTO VIRAL	
<b>IMAGENS:</b> 134 IMAGENS 2493_VEADO BORORÓ	
<b>MÉDICO VETERINÁRIO:</b>	ZALMIR SILVINO CUBAS

**ANEXO B – Laudos emitidos pelo Laboratório Pesquisa em Virologia Animal da UFMG.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM VIROLOGIA ANIMAL**

Belo Horizonte 22 de Dezembro de 2015

No primeiro semestre de 2015 foram recebidas no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG amostras clínicas de cervídeos que vieram ao óbito enviadas pelo médico veterinário Zalmir Silvino Cubas do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) Refugio Biológico de Bela Vista para pesquisa de ácido nucleico do Vírus da Lingua Azul.

As amostras foram submetidas à extração de RNA e Real Time PCR (Instituto Pirbright, Reino Unido) para detecção do ácido nucléico Viral.

**Dados da Amostra**

Espécie animal: *Mazama nana*

Localidade: Refúgio Biológico de Bela vista, CASIB, Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, Paraná.

Materiais recebidos: sangue, fragmentos de baço, linfonodo, fígado e pulmão.

Identificação da amostra: CASIB 2534

**Resultados obtidos:**

	ID Amostra	Material clínico	Resultado Final	Sorotipo
1	CASIB 2534	Tecido	Positivo	BTV 18
		Sangue	Positivo	BTV 18

Após o processamento das amostras foi possível detectar a presença do ácido nucléico do Vírus da Lingua Azul nas amostras de sangue e tecido CASIB 2534, isolar o vírus e identificar como sorotipo 18.

Atenciosamente,

Profª Zelia I. P. Lobato  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Escola de Veterinária - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA  
 DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
 LABORATÓRIO DE PESQUISA EM VIROLOGIA ANIMAL



Belo Horizonte 22 de Dezembro de 2015

No primeiro semestre de 2015 foram recebidas no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG amostras clínicas de cervideos que vieram ao óbito enviadas pelo médico veterinário Zalmir Silvino Cubas do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) Refugio Biológico de Bela Vista para pesquisa de ácido nucleico do Virus da Língua Azul.

As amostras foram submetidas à extração de RNA e Real Time PCR (Instituto Pirbright, Reino Unido) para detecção do ácido nucléico Viral.

Dados da Amostra

Espécie animal: *Mazama nana*

Localidade: Refúgio Biológico de Bela vista, CASIB, Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, Paraná.

Materiais recebidos: fragmentos de baço, linfonodo, fígado e pulmão.

Identificação da amostra: CASIB 2583

Resultados obtidos:

	ID Amostra	Material clínico	Resultado Final	Sorotipo
1	CASIB 2583	Tecido	Positivo	BT14

Após o processamento das amostras foi possível detectar a presença do ácido nucléico do Virus da Língua Azul na amostra de tecido **CASIB 2583**, isolar o vírus e identificar como sorotipo 14.

Atenciosamente,

Profª Zelia I. P. Lobato  
 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
 Escola de Veterinária - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA  
 DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
 LABORATÓRIO DE PESQUISA EM VIROLOGIA ANIMAL

Belo Horizonte 22 de Dezembro de 2015

No primeiro semestre de 2015 foram recebidas no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG amostras clínicas de cervideos que vieram ao óbito enviadas pelo médico veterinário Zalmir Silvino Cubas do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) Refugio Biológico de Bela Vista para pesquisa de ácido nucleico do Virus da Língua Azul.

As amostras foram submetidas à extração de RNA e Real Time PCR (Instituto Pirbright, Reino Unido) para detecção do ácido nucléico Viral.

Dados da Amostra

Espécie animal: *Mazama nana*

Localidade: Refúgio Biológico de Bela vista, CASIB, Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, Paraná.

Materiais recebidos: fragmentos de baço, linfonodo, fígado e pulmão.

Identificação da amostra: CASIB 2433

Resultados obtidos:

	ID Amostra	Material clínico	Resultado Final	Sorotipo
1	CASIB 2433	Tecido	Positivo	BTv3

Após o processamento das amostras foi possível detectar a presença do ácido nucléico do Virus da Língua Azul na amostra de tecido **CASIB 2433**, isolar o vírus e identificar como sorotipo 3.

Atenciosamente,

Profª Zelia I. P. Lobato  
 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
 Escola de Veterinária - UFMG



UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM VIROLOGIA ANIMAL**

Belo Horizonte 22 de Dezembro de 2015

No primeiro semestre de 2015 foram recebidas no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG amostras clínicas de cervídeos que vieram ao óbito enviadas pelo médico veterinário Zalmir Silvino Cubas do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) Refugio Biológico de Bela Vista para pesquisa de ácido nucleico do Virus da Lingua Azul.

As amostras foram submetidas à extração de RNA e Real Time PCR (Instituto Pirbright, Reino Unido) para detecção do ácido nucléico Viral.

**Dados da Amostra**

Espécie animal: *Mazama nana*

Localidade: Refúgio Biológico de Bela vista, CASIB, Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, Paraná.

Materiais recebidos: fragmentos de baço, linfonodo, fígado e pulmão.

Identificação da amostra: CASIB 2490

**Resultados obtidos:**

	ID Amostra	Material clínico	Resultado Final	Sorotipo
1	CASIB 2490	Tecido	Positivo	Não determinado

Após o processamento das amostras foi possível detectar a presença do ácido nucléico do Virus da Lingua Azul na amostra de tecido CASIB 2490, não foi possível isolar e identificar o vírus até o momento.

Atenciosamente,

Profª Zelia I. P. Lobato  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Escola de Veterinária - UFMG