

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Vírus da língua azul no Brasil: isolamento e caracterização genética de novos sorotipos em ovinos, bovinos, caprinos e cervídeos.

Michele dos Santos Lima

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo
2017

Michele dos Santos Lima

Vírus da língua azul no Brasil: isolamento e caracterização genética de novos sorotipos em ovinos, bovinos, caprinos e cervídeos.

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora:
Professora Dra. Edviges Maristela Pituco

São Paulo
2017

Eu, **Michele dos Santos Lima**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Lima, Michele dos Santos.

Vírus da língua azul no Brasil: isolamento e caracterização genética de novos sorotipos em ovinos, bovinos, caprinos e cervídeos. / Michele dos Santos Lima.
- São Paulo, 2017.
199 p.

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na produção animal.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Bluetongue virus in Brazil: isolation and genetic characterization of new serotypes in sheep, cattle, goats, deer.

1. Vírus da língua azul 2. Filogenia 3. Epidemiologia molecular 4. Isolamento 5. Ruminantes I. Lima, Michele dos Santos II. Pituco, Edviges Maristela. III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/Bibl./2017/015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Michele dos Santos Lima

Título: Vírus da língua azul no Brasil: isolamento e caracterização genética de novos sorotipos em ovinos, bovinos, caprinos e cervídeos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profª. Dra. Edviges Maristela Pituco Instituição: Instituto Biológico
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Profª. Dra. Claudia Del Fava Instituição: Instituto Biológico
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Profª. Dra. Dolores Ursula Mehnert Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas/USP
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia/USP
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Profª. Dra. Camila Malta Romano Instituição: Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo
Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha mãe Helena e ao Raul Sidarta, pela amizade e companherismo, por me mostrarem e ensinarem de diversas formas as muitas faces da vida. Obrigada por estarem ao meu lado, me apoiando e dando força em minhas escolhas!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Edviges Maristela Pituco, não apenas pela orientação, mas principalmente pela confiança durante todos estes anos em que fui sua orientada, aos muitos ensinamentos, colaborações e oportunidades que me proporcionou, bem como na realização deste trabalho e no meu crescimento profissional.

Ao Dr. Giovanni Savini pela orientação durante o período de doutorado sanduíche no *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"* (IZSAM), Teramo, Itália, e por disponibilizar regentes e a estrutura laboratorial dos departamentos de Virologia, “Ricerca e Sviluppo”, e Bioinformática, bem como a “Foresteria”.

À querida Prof. Dra. Claudia Del Fava (minha eterna tia Claudia), por me iniciar na vida científica, pelos muitos ensinamentos, pelas broncas e muitas risadas, mas principalmente pela amizade e carinho.

A todos os profissionais médicos veterinários, oficiais ou autônomos que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa com a realização da colheita e envio de amostras e por disponibilizá-las ao Laboratório de Viroses de Bovídeos para esta e outras pesquisas.

À M.^a Thaís Garcia da Silva (Pretinha), pelos vários conselhos e ensinamentos que levarei pra vida, pela amizade, profissionalismo, e companheirismo. Pelas várias risadas, viagens, “gita”, também pelo apoio e o estímulo nos momentos ruins. Por dividir comigo um dos períodos mais belos da minha vida.

Às queridas amigas, Maira Souza, Vívian Cardoso, Adeline Fernandes, Larissa Tuffani, pela convivência tornando tudo mais alegre, pela ajuda e companheirismo tanto profissional quanto pessoal, pelos encontros, risadas e momentos inesquecíveis de convivência.

Aos queridos amigos Vincenzo D’Innocenzo, Mirella Luciani, Micheli Podaliri, Dani Btrly, Luigi Iannett, Stafania Grilli, Massimo Spedicato e Maura Picella, que foram “la mia famiglia”, tornando muito mais alegre e especial este um ano longe de casa.

Ao Dr. Massimiliano Orsini, pelos ensinamentos de bioinformática, pela imensa ajuda e contribuição à minha pesquisa.

À Dr^a Ligía Maria Lembo Duarte pelos ensinamentos e colaboração nas análises filogenéticas.

Aos membros da banca examinadora Prof^a Dra. Cláudia Del Fava, Prof^a Dra. Dolores Ursula Mehnertao, ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, e a Prof^a. Dra. Camila Malta Romano, Prof. Dr. Ricardo Harakava, Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão e Prof. Dr. Massimiliano Orsini, pelas críticas e sugestões que enriqueceram este trabalho.

A toda equipe dos Departamentos de Virologia, “Ricerca e Sviluppo” e Bioinformática do IZSAM: Massimo Spedicato, Irene Carmine, Liana Teodori, Alessandra Leoni, Annapia Di Gennaro, Maura Picella, Claudia Casaccia, Miriam Berti, Sabrina Olivieri, Barbara Cipro,

Daniela Malatesta, Francesca Conte, Elisabetta di Felice, Guendalina Zaccaria, Valeria Marini, Ottavio Portanti e Alessio Lorusso, Cesare Cammà, Maurilia Marcacci, Marco Di Domenico, Federica Monaco, Massimo, Lugina, Massimiliano Orsini, Iolanda Mangone e Claudio Patavino pelo aprendizado, excelente convívio e colaboração.

Ao Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico (LVB/IB) pelo suporte financeiro para realização da pesquisa.

Aos funcionários, pesquisadoras e estudantes do Laboratório de Vírus de Bovídeos, Taís Ávila, Marta Vicenti, Alisete Assumpção, Regina Paixão, Raquel, Antera, João Simione, Eliana De Stefano, Líria Okuda, Adriana Nogueira, Bianca Freire, Vinícius Scenegaglia e Priscila Felício, pela colaboração.

Ao Instituto Biológico e ao programa de Pós-Graduação, docentes, funcionários, e aos colegas de curso, pela contribuição em meu crescimento profissional.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida durante os 04 anos do doutorado (Brasil e Itália - doutorado Sanduíche).

EPIGRAFE

“Não pode a ofensa ser mais intensa que o elogio, afinal a pequenez de uns não apequena o teu brio. A escolha é para os fortes, quem não escolhe vive a sentir calafrio a cada vez que a destemida vence um desafio.”

(Raul Sidarta)

RESUMO

LIMA, Michele Santos. **Vírus da língua azul no Brasil: Isolamento e caracterização genética de novos sorotipos em ovinos, bovinos, caprinos e cervídeos**. 2017. 190f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

A língua azul (LA) é uma doença infecciosa, podendo ser contagiosa, transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Culicoides* sp. O vírus da língua azul (VLA) é um RNA vírus de fita dupla e genoma segmentado, membro do gênero *Orbivirus* e da família *Reoviridae*, com alta variabilidade gênica. Até julho 2017 de foram reconhecidos pelo ICTV 27 sorotipos, contudo, estão descritos na literatura 29 sorotipos do VLA, em diversos países do mundo, localizados preferencialmente nas áreas tropicais e subtropicais. A doença afeta ovinos, caprinos, bovinos e diversas espécies de ruminantes silvestres, no entanto, no Brasil sua ocorrência clínica é mais evidente em cervídeos e algumas raças de ovinos, podendo apresentar altos índices de mortalidade, problemas reprodutivos, e expressiva diminuição na produção. A língua azul é doença de notificação obrigatória devido a sua patogenicidade e grande potencial de transmissão/difusão, consequentemente imposição de barreiras sanitárias para países afetados. Estudos clínicos e moleculares para caracterização dos sorotipos do VLA existente no Brasil são fundamentais para avaliar a situação epidemiológica. Este conhecimento contribuirá para o controle sanitário e assim minimizar o impacto negativo da doença e facilitar comercialização de produtos de origem animal, bem como evitar os riscos de introdução de novos sorotipos. Com objetivo de analisar, classificar e caracterizar filogeneticamente as sequências do VLA em amostras brasileiras detectadas no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2015 realizou-se: (i) isolamento do vírus em ovos embrionados de galinha (OEG) e adaptação em células BHK-21 dos isolados para a manutenção de banco viral; (ii) estabelecer as relações genéticas e epidemiológicas das estirpes do VLA pelo sequenciamento genômico e análise filogenética; (iii) determinar a ocorrência dos principais sorotipos nas diferentes espécies de ruminantes estudadas; (iv) verificar a endemicidade dos sorotipos identificados nas regiões analisadas e realizar a distribuição espacial do VLA conforme sorotipo identificado; (v) analisar a influência de fatores climáticos entre as regiões e associá-los aos sorotipos identificados; (vi) gerar conhecimento para produção de reagentes e para desenvolvimento de métodos de análise para VLA. Foram inoculadas por via intravenosa em OEG 207 amostras de ovinos, bovinos, caprinos e cervídeos. O material embrionário (SNC e órgãos dos OEG) com lesões características de VLA foi inoculado em

células BHK-21 resultando em 75% (498/662) de amostras adaptadas em cultura celular. A análise filogenética revelou a circulação do VLA sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-3, BTV-4, BTV-8, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-12, BTV-13, BTV-14, BTV-18, BTV-19, BTV-22 e BTV-24, em ovinos, bovinos, cervídeos e caprinos no Brasil. O sequenciamento dos 10 segmentos do VLA por meio de NGS forneceu importantes informações epidemiológicas sobre a disseminação desta doença no Brasil. Evidenciando as diferenças genéticas dos isolados brasileiros do VLA e sugerindo novos topotipos brasileiros. Constatou-se a endemicidade do BTV-1, BTV4 e BTV-12 na região estudada, bem como condições climáticas de favoráveis ao desenvolvimento do vetor. Neste estudo foram identificados pela primeira vez no Brasil os sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-13, e BTV-24. Os resultados encontrados geraram importantes informações epidemiológicas que auxiliarão na tomada de decisões para a condução dos programas sanitários brasileiros, na produção de reagentes e no desenvolvimento de novos métodos de análise e produção de vacinas.

PALAVRAS-CHAVE: VLA, isolamento, filogenia, epidemiologia molecular, ruminantes.

ABSTRACT

LIMA, Michele Santos. **Bluetongue vírus in Brazil: isolation and genetic characterization of new serotypes in sheep, cattle, goats, deer.** 2017. 190f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

The bluetongue (BT) is an infectious disease, and may be contagious, transmitted mainly by mosquitoes of the genus *Culicoides* sp. The bluetongue virus (BTV) is a double-stranded virus and segmented genome, member of the genus *Orbivirus*, family *Reoviridae*, and presents high genetic variability. It was recognized 27 serotypes by ICTV, however, described in the literature there are 29 BTV serotypes and they have been identified in tropical zone, subtropical zone and some temperate regions of the world. The disease affects sheep, goats, cattle and several species of wild ruminants, but in Brazil, its clinical signs are usually observed in deer and some breeds of sheep and include a high rate of mortality, reproductive problems, weight loss and indirect losses as a result of export restrictions. The BTV is a disease of mandatory notification, and restricts movement and trade of animals in virus-free areas, resulting in significant economic losses. Clinical and molecular studies to characterize BTV serotypes in Brazil are fundamental to assess the epidemiological situation and thus contribute to sanitary control in order to reduce the risks of introduction of new serotypes, minimize the negative impact of the disease and facilitate the exchange of products of animal origin. In order to analyze, classify and characterize phylogenetically BTV sequences in Brazilian samples detected from January 2007 to April 2015, (i) virus isolation in embryonated chicken eggs (EEC) and adaptation in BHK-21 cells the isolates from to maintenance of viral bank (ii) to establish the genetic and epidemiological relationship of BTV strains through genomic sequencing and phylogenetic analysis; (iii) to determine the occurrence of the main serotypes in the different ruminant species studied; (iv) verify the endemicity of the serotypes identified, analyzed regions and perform the spatial distribution of BTV according to the identified serotype; (v) to analyze the influence of climatic factors between the regions and to associate them with the serotypes, and (vi) generate knowledge for production of reagents and for the development of analysis methods for BTV. Were inoculated intravenously in EEC 207 samples of ovine, bovine, goats and deer. The embryonic material (CNS and organ EEC) with lesions characteristic of BTV was inoculated in BHK-21 cells resulting in 75% (493/662) samples adapted in cell culture. Phylogenetic analysis revealed circulating of serotypes BTV-1, BTV-2, BTV-3, BTV-4, BTV-8, BTV-8, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-12, BTV-13, BTV-

14, BTV-18, BTV-19, BTV-22 and BTV-24 in sequenced samples of sheep, cattle, cervids and a goat in Brazil. Sequencing of the 10 BTV segments by NGS provided important epidemiological information on the spread of this disease in Brazil. Evidencing genetic differences of Brazilian isolates of the BTV, suggesting new Brazilian topotypes. The endemicity of BTV-1, BTV-4 and BTV-12 in the studied region was verified, as well as climatic conditions favorable to the development of the vector. In this study the serotypes BTV-1, BTV-2, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-13, and BTV-24 were identified for the first time in Brazil. The results obtained generated important epidemiological information that will help in the decision making for the conduction of the Brazilian sanitary programs, in the production of reagents and in the development of new methods of analysis and production of vaccines.

KEYWORDS: BTV, isolation, phylogeny, molecular epidemiology, ruminants

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Representação esquemática da partícula do VLA – Ilustrando as diferentes proteínas codificadas pelo genoma dos *Orbivirus*. Capsídeo externo, formado pelas proteínas VP-2 e VP-5; capsídeo intermediário, formado pela proteína VP-7; e capsídeo interno, formado pela proteína VP3; Subnúcleo e associada ao núcleo interno a proteína VP-6; Núcleo interno, as proteínas estruturais associadas (VP-1 e VP-4). 33
- Figura 2 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) do dsRNA do VLA. Representação esquemática dos 10 segmentos lineares, organizados conforme seus respectivos pesos moleculares e respectivas proteínas. 35
- Figura 3 - Árvore filogenética construída utilizando o modelo matemático Neighbour-joining tree, a partir do alinhamento das sequências do Seg-2 de diferentes sorotipos de referência isolados do VLA, BTV-1w, 4w, 8w e 16w provenientes de Omã. A árvore foi construída utilizando matrizes de distância gerada, e o algoritmo p-distância usando foi determinado pelo MEGA5 (“bootstrap” de 500 réplicas). O VLA foi dividido em 26 grupos distintos com base nas sequências de Seg-2, refletindo relações sorológicas entre sorotipos de vírus..... 37
- Figura 4 – Árvore filogenética de comparação dos outros sorogrupos do gênero *Orbivirus*, através das proteínas T2. Esta proteína é equivalente à proteína VP3 do VLA. A árvore foi construída pelo algoritmo Neighbor-joining, com matrizes de distância calculada usando o algoritmo de determinação de distância p, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas..... 38
- Figura 5 - Quatro exemplares de *Culicoides imicola* 44
- Figura 6 - Ciclo de transmissão clássica do vírus da língua azul. 48
- Figura 7 -Funcionamento do processo de sequenciamento do Illumina®. 68
- Figura 8 - Visualização dos ramos venosos para inoculação, com auxílio de um ovoscópio. . 79
- Figura 9 - Inoculação de amostra positiva em OEG..... 79
- Figura 10 -Foto da necropsia de um embrião de galinha inoculado com amostra positiva para o VLA – coleta das vísceras para posterior análise. 80
- Figura 11 -Foto da necropsia de um embrião de galinha inoculado..... 81
- Figura 12 - Esquema ilustrativo do método SISPA, utilizando no sequenciamento genômico do VLA..... 87
- Figura 13 -Distribuição espacial dos animais positivos para VLA, conforme a espécie animal e a localização das propriedades nos Estados brasileiros. 92
- Figura 14 - Total de amostras isoladas em OEG..... 93

- Figura 15 – Embrião de galinha morto ao 4º dia após a inoculação de amostra com suspeita clínica para LA, o mesmo apresenta diversos pontos hemorrágicos em cabeça e tronco, além de inúmeras petéquias hemorrágicas em pescoço, abdômen e membros inferiores (setas)..... 94
- Figura 16 – Embriões de galinha mortos no 6º dia após a inoculação. Da esquerda para a direita, o primeiro embrião (A) foi inoculado com meio MEM (controle negativo), apresentando características normais de desenvolvimento. O segundo embrião (B), inoculado com amostra positiva para o VLA, apresenta aspecto hemorrágico generalizado, visível retardo no desenvolvimento embrionário, teratogenia de membro inferior direito e falha no fechamento das cavidades abdominal e torácica, com exposição das vísceras (setas)..... 95
- Figura 17 - Embrião de galinha inoculado com amostra positiva do VLA, morto ao 4º dia após a inoculação. Diversos focos hemorrágicos em SNC, associado à necrose liquefativa (malácia) (setas). Não fechamento das cavidades abdominal e torácica, associada a exposição visceral (setas). 95
- Figura 18 - Porcentagem de morte embrionária calculada em dias após isolamento das amostras..... 96
- Figura 19-Esquema ilustrativo exemplificando a formação da coleção de amostras decorrentes do isolamento em OEG. 97
- Figura 20: Célula BHK-21, controle negativo, 20x..... 98
- Figura 21 - Efeito citopático do VLA da amostra positiva LVB-14 9961 (“Pool” de órgãos - OEG), ECP observado três dias após a infecção celular em BHK-21. 20X..... 98
- Figura 22 -Efeito citopático do VLA, amostra positiva, quatro dias após a infecção em cultura celular BHK-21, 20x. 98
- Figura 23 - Porcentagem de amostras analisadas pelo isolamento em cultura celular, BHK-21. 99
- Figura 24 - Descrição dos resultados das análises realizadas para otimização da qualidade do material genético..... 100
- Figura 25 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa PAUP, sob o critério da máxima verossimilhança, após determinar o modelo de reconstrução filogenética de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + I + G, do alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-4, BTV-10, BTV11, BTV17, BTV-20 e BTV-24 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “A”. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas referentes ao sorotipo BTV-4 estão sinalizadas com um quadrado vermelho, as amostras pertencentes ao BTV-10 estão sinalizadas com um círculo na cor verde-piscina. 107
- Figura 26 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de

nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-3, BTV-13, e BTV16 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “B”. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas referentes ao BTV-3 estão sinalizadas com um círculo verde, e as amostras pertencentes ao BTV-13 estão sinalizadas com um quadrado na cor “pink”, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados..... 108

Figura 27 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-6, BTV-14, e BTV21 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “C”, utilizou-se também o sorotipo BTV-25 como grupo externo. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que a amostra sequenciada referente ao BTV-14 está sinalizada com um círculo vermelho, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados. 108

Figura 28 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-8, BTV-18, e BTV23 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “D”. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas são referentes ao BTV-18 e estão sinalizadas com um círculo na cor verde-piscina, com valor de bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados. Somente valores acima de 60% foram representados 109

Figura 29 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-5 e BTV-9 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “E”, utilizou-se também o sorotipo BTV-25 como grupo externo. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e /a espécie animal sendo que a amostra sequenciada referente ao BTV-9 está sinalizada com um círculo vermelho, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados. 109

Figura 30 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa MEGA 7.0 sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-7 e BTV19 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “F”, utilizou-se também o sorotipo BTV-25 como grupo externo. As amostras sequenciadas, referentes ao BTV-19 foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem, e a espécie animal e sinalizadas com um círculo na cor verde-piscina, com valor de bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados. 110

Figura 31 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa PAUP, sob o critério da máxima verossimilhança, após determinar o modelo de reconstrução filogenética de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + G, do alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-12 e BTV-22 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “G”, utilizou-se também o sorotipo BTV-8 como grupo externo. As amostras sequenciadas foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas referentes ao BTV-12 estão

- sinalizadas com um triângulo azul escuro, e as amostras pertencentes ao BTV-22 estão sinalizadas com quadrado na cor verde-piscina, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas..... 111
- Figura 32 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipo BTV-1 do VLA, pertencente ao sorogrupo “H”. As amostras sequenciadas foram destacadas e identificadas com o n° de registro, a origem e a espécie animal, e estão sinalizadas com um círculo verde, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados..... 112
- Figura 33 - Climograma do município de Paty de Alferes-RJ, com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total nos anos de 2013, 2014 e 2015..... 114
- Figura 34 - Distribuição dos sorotipos do VLA, conforme o sorotipo sequenciado e a espécie animal afetada, e a localização geográfica das propriedades nas mesorregiões do Estado de São Paulo. 136
- Figura 35 - Árvore obtida sob condições de máxima verossimilhança, a partir da análise das amostras sequenciadas, com as referências para os 28 sorotipos do VLA foi construída utilizado como critério de otimização nas análises filogênicas, o modelo matemático evolutivo de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + I + G, onde os parâmetros de substituição foram: $\ln L = -121016.0938$, valor de $I = 0,0040$, valor de $G = 1,7278$ com “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados..... 199

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das proteínas estruturais do VLA de acordo com o segmento, nomenclatura, localização e função.....	40
Tabela 2 - Descrição das proteínas não estruturais do VLA de acordo com o segmento, nomenclatura, localização e função.....	40
Tabela 3 -Dados das amostras analisadas, conforme idade, origem e espécie.....	75
Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação e tamanho do fragmento resultante.	87
Tabela 5 - Classificação climática dos municípios referente à amostragem estudada, conforme local de coleta (Estado e Município) e geolocalização (latitude e longitude).	92
Tabela 6 - Mortalidade embrionária calculada em dias pós inoculação, com o número de embriões mortos, e a porcentagem.	96
Tabela 7 - Porcentagens da diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-1.	102
Tabela 8 - Porcentagem da diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP2 para o sorotipo BTV3.	102
Tabela 9 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-4.	102
Tabela 10 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-9.	103
Tabela 11 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-10.	103
Tabela 12 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-12.	103
Tabela 13 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-13.	104
Tabela 14 -Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-14.	104
Tabela 15 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-18.	104
Tabela 16 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-19.	105

Tabela 17 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-22.	105
Tabela 18 - Caracterização climática dos municípios com amostras sequenciadas	112
Tabela 19 - Temperatura média, precipitação média e mês/ano conforme a data da colheita das amostras por município do Estado de São Paulo.....	113
Tabela 20 - Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de município de Paty de Alferes nos anos de 2013, 2014 e 2015.	114
Tabela 21 - Os resultados obtidos após as análises de bioinformática, foram separados por sorotipo conforme a identificação animal, espécie, cidade/região e Estado de ocorrência.	184
Tabela 22 - Sequências obtidas no GenBank e utilizadas como referência para a realização da análise filogenética do VLA das amostras sequenciadas, bem como o número de acesso, país em que o vírus foi isolado, o ano e os artigos publicados.....	186
Tabela 23 - Resultados do percentual das análises de identidade entre as amostras analisadas e os 28 sorotipos do VLA, com base na sequência de nucleotídeos do segmento 2, região ORF da proteína VP2.	188

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	=	Antígeno
Ac	=	Anticorpo
ARCO	=	Associação Brasileira de Criadores de Ovinos
ATB	=	Antibiótico
ATCC	=	“American Type Culture Collection”
BHK-21	=	“Baby Hamster Kidney”- Linhagem celular de rins de hamster
BLAST	=	“Basic Local Alignment Search Tool”
BTV	=	“Bluetongue viral” – Vírus da língua azul
BTV-1	=	Sorotipo 1 do vírus da língua azul
BTV-2	=	Sorotipo 2 do vírus da língua azul
BTV-3	=	Sorotipo 3 do vírus da língua azul
BTV-4	=	Sorotipo 4 do vírus da língua azul
BTV-5	=	Sorotipo 5 do vírus da língua azul
BTV-6	=	Sorotipo 6 do vírus da língua azul
BTV-7	=	Sorotipo 7 do vírus da língua azul
BTV-8	=	Sorotipo 8 do vírus da língua azul
BTV-9	=	Sorotipo 9 do vírus da língua azul
BTV-10	=	Sorotipo 10 do vírus da língua azul
BTV-11	=	Sorotipo 11 do vírus da língua azul
BTV-12	=	Sorotipo 12 do vírus da língua azul
BTV-13	=	Sorotipo 13 do vírus da língua azul
BTV-14	=	Sorotipo 14 do vírus da língua azul
BTV-15	=	Sorotipo 15 do vírus da língua azul
BTV-16	=	Sorotipo 16 do vírus da língua azul
BTV-17	=	Sorotipo 17 do vírus da língua azul
BTV-18	=	Sorotipo 18 do vírus da língua azul
BTV-19	=	Sorotipo 19 do vírus da língua azul
BTV-20	=	Sorotipo 20 do vírus da língua azul
BTV-21	=	Sorotipo 21 do vírus da língua azul
BTV-22	=	Sorotipo 22 do vírus da língua azul

BTV-23	=	Sorotipo 23 do vírus da língua azul
BTV-24	=	Sorotipo 24 do vírus da língua azul
BTV-25	=	Sorotipo 25 do vírus da língua azul
BTV-26	=	Sorotipo 26 do vírus da língua azul
BTV-27	=	Sorotipo 27 do vírus da língua azul
CCPS	=	Centro de Coleta e Preparação de Sêmen
CP	=	Citopatogênico
Cp	=	Limiar de detecção da PCR em tempo real
cDNA	=	Ácido desoxirribonucléico complementar
CIF	=	Custo indireto de fabricação
Ct	=	Threshold Cyler
DEPC	=	Diethyl Pirocarbonato
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	=	Segmentos de RNA fita dupla
ECP	=	Efeito Citopático
EHDV	=	“Epizootic hemorrhagic disease virus” - Vírus da doença epizoótica hemorrágica
ELISA	=	“Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”
ELISA -CFS	=	“Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay” - Ensaio Imunoenzimático por competição de fase sólida
EU	=	União Européia
EUA	=	Estados Unidos da América
g	=	Gramma
h	=	Hora
IA	=	Inseminação artificial
IB	=	Instituto Biológico
IBGE	=	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	=	International Committee on Taxonomy of Viruses
IDGA	=	Imunodifusão em Gel de Ágar
IgG	=	Imunoglobulina G
INTA	=	Instituto Nacional de Agricultura e Tecnologia
IUCN	=	“International Union for Conservation of Nature and Natural Resources”

IZSAM	=	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"</i>
LA	=	Língua azul
LVB	=	Laboratório de Virose de Bovídeos
MAPA	=	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	=	“Minimal Essential Medium” - Meio Essencial Mínimo
MERCOSUL	=	Mercado Comum do Sul
mL	=	Mililitro
µL	=	Microlitro
mM	=	Milimolar
µM	=	Micromolar
Min	=	Minuto
NGS	=	“Next Generation Sequencing” – Sequenciamento de Nova Geração
mRNA	=	ácido ribonucléico mensageiro
nm	=	Nanômetros
nPCR	=	“nested” de PCR
NCBI	=	“National Center for Biotechnology Information”
NS1, 2 ou 3	=	“non-structural protein”
NUPECCE	=	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
OEG	=	Ovo embrionado de galinha
OIE	=	“World Organization for Animal Health ”
ORF	=	“open reading frame ”
Panaftosa	=	Centro Pan-Americano de Febre Aftosa
pb	=	pares de Base
PBS	=	solução salina tamponada com fosfatos
PIB	=	Produto Interno Bruto
pH	=	potencial hidrogeniônico
PCR	=	Reação em cadeia pela Polimerase
qPCR	=	Reação quantitativa de polimerização em cadeia do DNA
RCF	=	Força Centrífuga Relativa
RNA	=	Ácido Ribonucléico
RPM	=	Rotação por minuto

RT	=	Transcrição reversa
RT-PCR	=	Transcrição reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase
RT-qPCR	=	Transcrição reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa
seg	=	Segundos
SFB	=	Soro Fetal Bovino
SNC	=	Sistema nervoso central
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
UV	=	Ultravioleta
V	=	Voltagem
VERO	=	Linhagem celular de rim de macaco verde africano (Verda Reno)
VLPs	=	“Vírus like particles” - Partículas tipo vírus
VN	=	Vírusneutralização
VP	=	Proteína viral
UC	=	Unidades de Conservação

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	=	Grau Celsius
CO ₂	=	Dióxido de Carbono
H ₂ O	=	Água
®	=	Marca Registrada
™	=	Marca de fábrica
∞	=	Infinito

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Gerais	30
2.2 Específicos	30
3. REVISÃO DE LITERATURA	31
3.1. Histórico	31
3.2. Classificação e taxonomia.....	32
3.3. Genoma do vírus da língua azul e características moleculares	34
3.4. Hospedeiros.....	41
3.4.1 Ruminantes	41
3.4.2 Carnívoros e demais espécies	42
3.5. Principais vetores relacionados à transmissão do VLA	43
3.6. Transmissão	46
3.6.1 Transmissão Clássica – Presença de Vetor Biológico	47
3.6.2 Outras Formas de Transmissão	49
3.7 Fatores ambientais.....	51
3.8 Patogênese do vírus da língua azul	52
3.9. Sinais clínicos	54
3.10. Epidemiologia	55
3.11 Diagnóstico	61
3.12 Perdas econômicas em decorrência do VLA	70
3.13 Principais medidas de controle e prevenção da LA	70
4. MATERIAIS E MÉTODOS	74
4.1 Comitê de Ética.....	74
4.2 Amostragem	74
4.2.1 Origem das Amostras.....	74
4.2.2 Preparo das amostras de sangue.....	76
4.2.3 Preparo das amostras de tecido	76
4.2.4 Envio das amostras para o <i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"</i> (IZSAM), Teramo, Itália.	76
4.3 Estirpe viral padrão	77
4.3.1 Amostras controle utilizadas no isolamento viral	77
4.4. Culturas celulares	77
4.5. Isolamento do vírus da língua azul.....	78
4.5.1. Isolamento em Ovo Embrionado de Galinha (OEG).....	78
4.5.2. Isolamento em Cultura Celular BHK-21 – Formação do Banco Viral	81
4.6 Amostras controle utilizados nos testes moleculares	82
4.7 Extração do RNA	82
4.8 RT-qPCR realizada no Brasil.....	83
4.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores.....	83
4.8.2. Condições de reação.....	83
4.9. RT-qPCR realizada na Itália	84
4.9.1 Oligonucleotídeos iniciadores.....	84
4.10 Sequenciamento	85

4.10.1 Análises prévias ao sequenciamento.....	85
4.10.2 Sequenciamento	88
4.11. Análise de dados – Bioinformática	89
4.12 Análises das Sequências.....	90
4.13 Análises Filogenéticas.....	90
4.14 Análise Climática das regiões	91
5. RESULTADOS.....	93
5.1 Isolamento em ovo de galinha embrionado (OEG)	93
5.2 Isolamento em cultura celular BHK-21 - formação do banco viral	97
5.3 Sequenciamento	100
5.3.1 PCR.....	100
5.3.2 Análises das sequências	101
5.3.3 Análises filogenéticas	105
5.4 Análise Climática	112
5.4.1 Municípios do Estado de São Paulo.....	113
5.4.2 Região do Vale do Paraíba Fluminense – Rio de Janeiro	113
6. DISCUSSÃO.....	115
6.1 Isolamento em OEG.....	115
6.2 Isolamento em cultura celular BHK-21	116
6.3 Sequenciamento	117
6.3.1 Análise filogenética por sorotipo	117
6.3.2 Análise por Município	125
6.4 Análise Climática.....	137
7. CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	140
ANEXOS.....	181
ANEXO 1 – Aprovação do Trabalho no Comitê de Ética (Frente)	182
ANEXO 1 - Comissão de ética (Verso)	182
ANEXO 2 – Tabela de resultados do sequenciamento	184
ANEXO 3 - Tabela com as sequências de referência obtidas no GenBank.....	186
ANEXO 4 – Tabela com os resultados do percentual das análises de identidade ...	188
ANEXO 5 – Árvore filogenética.....	199

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro tem como destaque no cenário mundial a bovinocultura, com o segundo maior rebanho efetivo do mundo, em torno de mais de 209 milhões de cabeças (IBGE, 2014), nos últimos anos alternando com os EUA a primeira e segunda posição. Além disso, desde 2004, o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. O valor bruto da produção bovina das cadeias de carne e de leite é estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os Estados brasileiros, evidenciando a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (MAPA 2016).

A caprinocultura e a ovinocultura também têm se destacado no agronegócio brasileiro. Atualmente, o Brasil ocupa o 18º lugar do “ranking” mundial de exportações, com um rebanho estimado em 14 milhões de animais. O rebanho caprino encontra-se principalmente no Nordeste, com ênfase para os Estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará. A ovinocultura tem maior representatividade nos Estados da Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul (MAPA 2016).

Face à crescente importância socioeconômica das cadeias produtivas citadas, torna-se primordial a segurança sanitária dos rebanhos, onde os problemas de saúde animal são um dos principais fatores a limitar a produção e encarecer os produtos. Além de ocasionar a baixa encarecer a produtividade, e comprometer a qualidade final do produto, os problemas sanitários causam graves consequências socioeconômicas impactando diretamente sobre a comercialização de animais e seus subprodutos, impedindo o acesso aos principais mercados consumidores, acarretando ainda menor segurança para com o alimento fornecido e bem-estar animal.

No contexto sanitário, a língua azul (LA), também conhecida por “bluetongue” (BT) está incluída na lista da “World Organization for Animal Health” - OIE (2016) de enfermidades infecciosas de importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos (principalmente sêmen e embriões, bastante comercializados devido ao alto valor genético do rebanho nacional), gerando embargos e restrições por países importadores, além das perdas diretas em rebanhos afetados.

A LA é uma doença viral, infecciosa, podendo ser contagiosa (MAAN et al., 2016), de etiologia viral, transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Culicoides* sp., também chamado de “mosquito-pólvora”. A doença afeta ovinos, caprinos, bovinos e diversas

espécies de ruminantes silvestres, de notificação obrigatória devido a sua patogenicidade e grande potencial de transmissão/difusão (OIE, 2016).

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

Em ovinos e cervídeos, a enfermidade é particularmente importante, podendo atingir 70% de mortalidade em ovinos e 100% em cervídeos (OIE, 2016), resultante de inflamação e hemorragias das membranas da mucosa oral, nariz e intestinos. Em caprinos e bovinos a infecção pelo vírus da língua azul raramente apresenta sinais clínicos da doença e a taxa de mortalidade é muito baixa ou nula (LOBATO, 1999; 2015). No entanto, bovinos são importantes no ciclo epidemiológico da doença, pois apresentam viremia prolongada, em torno de 60 dias (OIE, 2016), funcionando como reservatórios do VLA, a partir dos quais os vetores podem se infectar e transmitir o vírus a outros ruminantes, mantendo-o viável e circulante nas populações susceptíveis a infecção (LIMA, 2013; GORCHS; LAGER, 2001).

Para a movimentação de animais, nos países que compõem o MERCOSUL (Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Venezuela), é obrigatória a análise para pesquisa do vírus da língua azul (VLA) ou de anticorpos, tanto em animais quanto em seus produtos (Resolução MERCOSUL/GMC/RES N°. 16/05).

Apesar da importância econômica, pouco se conhece sobre as estirpes do vírus da língua azul (VLA) existentes no Brasil, pois a maioria dos estudos realizados com representatividade populacional são para detecção de resposta imune, e revelam apenas infecções prévias (presença de anticorpos contra o vírus no soro) utilizando os métodos de imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), da virusneutralização (VN), e pelo “Enzyme-Linked Immubocorbent Assay” (ELISA) (LOBATO, 1996; PELLEGRIN et al., 1997; MELO et al., 2000; LOBATO et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2008; VENDITTI, 2009; BERNARDES, 2011; MARTINS e t al., 2011; LIMA et al., 2012; LIMA, 2013; LOBATO et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2016). Contudo, são poucos os relatos clínicos da doença, evidenciando uma disseminação silenciosa do VLA nos rebanhos do país.

Foram descritos 29 sorotipos diferentes do VLA (LORUSSO et al., 2016; MAAN et al., 2016), reconhecidos pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV” ainda são 27 sorotipos (MAAN et al., 2016).

Em rebanhos bovinos no Brasil, já foram detectados os sorotipos do VLA 4 (BTV-4), sorotipo 8 (BTV-8), sorotipo 10 (BTV-10), e sorotipo 16 (BTV-16), em amostras de sêmen e sangue (GROOCOCK; CAMPBELL, 1982; GASPARINI et al., 2014). Em ovinos foram detectados os sorotipos do VLA BTV-4, BTV-8, BTV-10, o sorotipo 12 (BTV-12) e sorotipo 17 (BTV-17), isolados a partir de amostras clínicas de diferentes focos ocorridos no Brasil (CLAVIJO et al., 2002; LIMA 2013; BALARO et al., 2014; ROSA et al., 2014a; 2014b). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, já notificou a OIE sobre a ocorrência dos sorotipos 3 (BTV-3), sorotipo 14 (BTV-14), sorotipo 18 (BTV-18), sorotipo 19 (BTV-19) e sorotipo 22 (BTV-22) do VLA em cervídeos no Estado do Paraná.

Condições de temperatura e umidade em todo o Brasil favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores, facilitando a endemicidade da doença, pois o clima é o principal fator de risco, já que os *Culicoides* requerem calor e umidade para se reproduzirem, bem como clima quente e úmido e pouco vento para se alimentarem. As estações do ano, como primavera e verão, favorecem o seu aparecimento e reprodução e conseqüentemente, a maior transmissão da doença. A população de insetos tende a baixar no outono e inverno, quando a temperatura é mais baixa. A ocorrência da LA depende de uma complexa interação entre hospedeiro, vetores, clima, sorotipos virais circulantes e suas inter-relações (LIMA, 2013).

Considerando as condições climáticas brasileiras, adequadas ao desenvolvimento dos vetores, a detecção do VLA em animais, torna-se necessário os estudos para preencher a lacuna do conhecimento relacionada aos sorotipos existentes, e o impacto da infecção sobre a produtividade nos rebanhos, bem como nas populações de ruminantes silvestres existentes do Brasil.

O diagnóstico precoce e específico torna-se inevitável e importante como recurso para evitar a propagação da doença, gastos com tratamentos, focos epidemiológicos e medidas de controle, bem como restrições econômicas. Além disso, permite análises, em curto período de tempo, para certificação de grande número de animais e produtos de origem animal, como sêmen e embriões destinados ao comércio nacional e internacional (LIMA, 2013).

Dessa forma, objetivou-se estabelecer a análise filogenética das sequências do VLA a partir de amostras de campo isoladas no Brasil, bem como pesquisar a ocorrência dos diferentes sorotipos do VLA em diferentes espécies, aumentando o conhecimento em relação

às estirpes virais circulantes no Brasil, a fim de estabelecer protocolos e diretrizes para aplicação de métodos apropriados de controle da doença, com intuito de conhecer a relação entre os isolados de campo e as estirpes tidas como “exóticas” (estirpes sem ocorrência no país, que ainda não foram notificadas ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, órgão do Governo Federal responsável por notificar a OIE).

Estudos sobre a doença são essenciais, pois visam fornecer subsídios, tais como a situação epidemiológica e caracterização dos sorotipos existentes, para a vigilância sanitária e epidemiológica. Contribuindo com a defesa sanitária animal para elaboração e implementação de programas de vigilância para o VLA, com a finalidade de diminuir os riscos de introdução de novos sorotipos; promover melhor qualidade de vida e bem-estar animal, minimizar o impacto negativo da doença e facilitar o intercâmbio de animais e de produtos de origem animal.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente estudo teve por objetivo, analisar classificar e caracterizar filogeneticamente as sequências do VLA em amostras brasileiras detectadas no período de janeiro de 2007 a abril de 2015, mantidas na coleção viral do Laboratório de Vírus de Bovídeos, destinadas ao estudo de virulência, patogenicidade, desenvolvimento de reagentes.

2.2 Específicos

1. Isolamento do VLA em ovos embrionados de galinha (OEG) a partir de amostras positivas, detectadas pela RT-qPCR, e adaptação em células BHK-21 dos isolados em OEG para manutenção de banco viral;
2. Estabelecer as relações genéticas e epidemiológicas das estirpes do VLA pelo sequenciamento genômico e análise filogenética, realizados no “Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise G. Caporale”, Teramo, Itália, (referência internacional pela OIE no diagnóstico de LA ;
3. Verificar a endemicidade dos sorotipos identificados nas regiões analisadas e mapear a distribuição espacial do VLA conforme o sorotipo identificado;
4. Gerar conhecimento para produção de reagentes e para desenvolvimento de métodos de análise para VLA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico

Até o ano de 1905, a LA era conhecida por "Epizootia Catarral das Ovelhas" ou "malarial catarral fever", ainda com etiologia desconhecida. No mesmo ano passou a ser conhecida por "língua azul" devido à cianose observada na língua e na mucosa oral dos animais doentes (BREARD et al., 2004). Em 1906, a ocorrência da doença passou a ser associada com a presença de um vírus, estabelecendo assim a etiologia da doença, posteriormente denominado "Bluetongue vírus" (BTV).

A LA foi descrita inicialmente na África do Sul no final do século XVIII em ovinos importados, em 1918. A doença já tinha sido descrita em ruminantes na África Ocidental e em vários outros países da África Subsaariana (TOMORI et al., 1992). Entretanto, em 1924 a doença foi confirmada fora do continente africano, na ilha de Chipre, onde nos anos de 1943 e 1944, ocorreram importantes surtos da doença, com elevadas taxas de mortalidade (70% dos animais - 2.500 ovelhas). Em 1943, a doença também foi responsável por ocasionar uma importante epizootia na Palestina. Após estas epizootias fora do continente africano, observou-se que a incidência da doença clínica é altamente variável, a taxa de mortalidade e a severidade dos sinais clínicos são influenciadas pela espécie, raça, idade e pela condição de saúde do animal infectado, pelo sorotipo e por interações com o ambiente (MCLACHLAN, 1994).

A doença também foi identificada em 1982, nos Estados Unidos, e em 1956 e 1957 em Portugal e Espanha, com aproximadamente 75% de mortalidade, levando a óbito de cerca de 180.000 ovinos, causando sérios prejuízos à pecuária nesta região. Desde então, devido aos surtos de LA ocorridos na Europa, Oriente Médio, Ásia e Estados Unidos no início dos anos 1940 e 1950, a LA passou a ser caracterizada como uma "doença emergente" (ROY, 2008).

Em 2004, a doença passou a atingir também o norte da Europa, onde ocorreram diversos surtos de LA, nestes, mais de um milhão de ovelhas morreram devido à doença. Estudos realizados no mesmo período demonstraram que *Culicoides*, espécie de vetor relacionada à transmissão do VLA adquiriu uma ampla distribuição geográfica: devido à adaptações climáticas, a espécie ampliou sua extensão territorial cerca de 800 km mais ao

norte da Europa, presumivelmente pelo clima ter se tornado mais quente, importante fator responsável pela disseminação do vírus (OIE, 2016).

No Brasil, o VLA foi isolado e identificado pela primeira vez em 1980, quando foi isolado o sorotipo viral 4 de bovinos exportados para o EUA (GROOCOOCK; CAMPBELL, 1982). Durante um surto de LA em ovinos no Paraná, Clavijo et al. (2002) conseguiram isolar e identificar a estirpe 12 do VLA.

A partir da primeira ocorrência, vários inquéritos sorológicos foram realizados, incluindo diferentes espécies de ruminantes domésticos, evidenciando sorologia positiva para o VLA em diversos Estados brasileiros.

3.2. Classificação e taxonomia

O VLA (“Bluetongue Virus”, BTV) é membro do gênero *Orbivirus*, subfamília *Sedoreo virinae*. O VLA é maior dentre os 15 gêneros classificados dentro da família *Reoviridae*, sendo esta a maior família de todos os vírus RNA de fita dupla (dsRNA). Os 15 gêneros reconhecidos como *Reoviridae* estão agrupados em duas subfamílias (*Sedoreovirinae* e *Spinareovirinae*) e podem ser diferenciados de acordo com as características de tamanho, número de camadas e estrutura do capsídeo, número de segmentos do genoma, natureza e número das proteínas estruturais, além do padrão de reatividade sorológica. A família *Reoviridae* também apresenta grande diversidade de hospedeiros, podendo infectar fungos, animais invertebrados (artrópodes e moluscos), vertebrados (peixes, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem) e plantas. Os vírus pertencentes à família *Reoviridae* podem ter seu genoma constituído por 10, 11 ou 12 segmentos de dsRNA (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus - ICTV, 2016).

O vírus possui morfologia esférica, constituído de um capsídeo externo envolvendo outro capsídeo intermediário (“core” - núcleo) e, ainda, uma camada proteica interna (“sub-core” subnúcleo). Os vírions não são envelopados, possuem tamanho característico de 60-85 nm de diâmetro, e as proteínas que formam a partícula viral estão dispostas em duas ou três camadas concêntricas que conferem a ela uma simetria icosaédrica (ICTV, 2016).

O núcleo icosaédrico do VLA é circundado pela camada externa ou capsídeo, que é composto pelas proteínas VP2 e VP5, conforme a Figura 1.

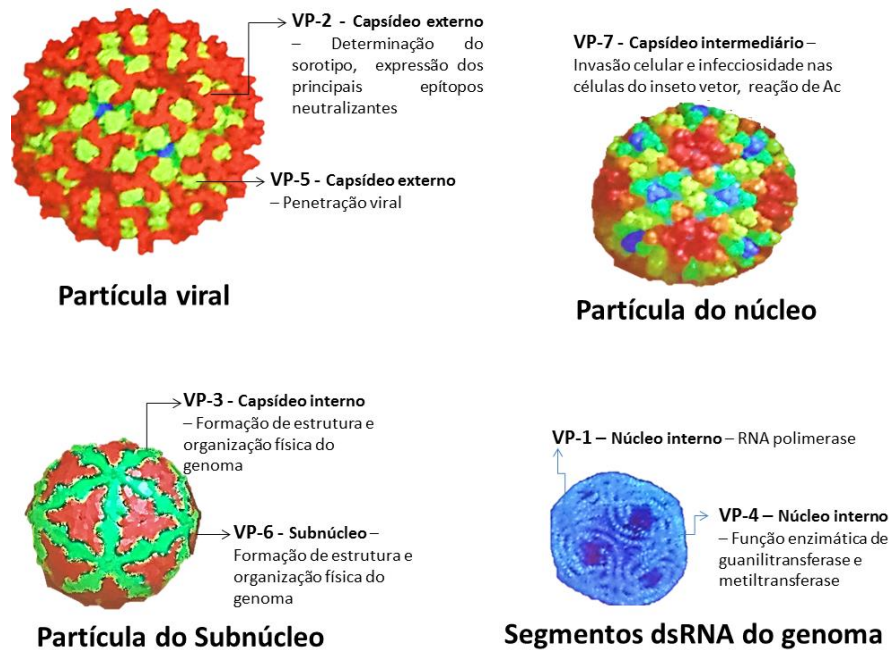


Figura 1- Representação esquemática da partícula do VLA – Ilustrando as diferentes proteínas codificadas pelo genoma dos *Orbivirus*. Capsídeo externo, formado pelas proteínas VP-2 e VP-5; capsídeo intermediário, formado pela proteína VP-7; e capsídeo interno, formado pela proteína VP-3; Subnúcleo e associada ao núcleo interno a proteína VP-6; Núcleo interno, as proteínas estruturais associadas (VP-1 e VP-4).

Fonte: Lima, 2017.

Conforme ilustrado na Figura 1, o VLA possui capsídeo externo com cerca de 80 nm de diâmetro, constituído de 180 cópias de VP2 e 360 cópias de VP5. O capsídeo intermediário é circundado por partículas do core, formado por capsômeros em forma de anel com 73 nm, constituído de 780 cópias do VP7, e “sub-core” com 59 nm de diâmetro externo 46 nm de diâmetros interno, constituído de 120 cópias de VP3 (BHATTACHARYA; ROY; ROLE 2010). Dentro desse “sub-core” de VP3 encontram-se as outras proteínas estruturais do vírus: VP1 que apresenta função de RNA polimerase RNA dependente, VP4 que apresenta função de adicionar o “cap” aos mRNA durante a replicação, e VP6 que apresenta atividade de helicase e NTPase.

A multiplicação viral do VLA ocorre tanto em células de artrópodes, quanto em vertebrados, apresentando algumas diferenças na replicação nesses diferentes hospedeiros (MAAN et al., 2011). Em células de mamíferos, a replicação viral se inicia com a absorção viral envolvendo componentes do capsídeo externo, que não são glicosilados, e receptores na membrana plasmática celular (ALFIERI et al., 2007). Posteriormente ocorre a penetração do VLA por endocitose, e a sua liberação no citoplasma requer pH ácido no endossoma. A queda do pH altera a conformidade da VP5, expondo peptídeos que formam poros na membrana do endossoma. Isto permite que partículas do “sub-core” (complexo enzimático que transcreve os

10 segmentos genômicos para mRNA e adicionam “cap” aos mesmos que são subsequentemente traduzidos para todas as proteínas virais no citoplasma das células infectadas) sejam liberadas no citoplasma e iniciem a replicação do genoma.

Embora o VLA seja liberado das células de mamíferos por lise celular, em alguns tipos celulares ele também pode sair por brotamento ou protrusão (BHATTACHARYA; ROY; ROLE 2010).

Nas células de mamíferos, a replicação dos *Orbivirus* bloqueia a síntese de proteínas pela célula hospedeira que usualmente resulta em lise celular e liberação das partículas virais, porém nos insetos não há este bloqueio. Nas células dos insetos, ocorre a liberação contínua de partículas virais e a reinfecção dessas células pode ocorrer com frequência (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000).

O VLA é bastante estável na presença de proteínas e em sangue mantido sob congelamento à temperatura -80°C ou inferior, porém é instável quando armazenado a -20°C . O vírus é sensível ao $\text{pH} < 6,0$ e $> 8,0$, aos desinfetantes comuns como compostos fenólicos e iododóforos e as β -propiolactona, sendo inativado pelo calor a 50°C por três horas ou 60°C por 15 minutos (OIE, 2016).

O VLA pode sobreviver por 9 a 12 meses, mesmo em países com invernos típicos e sem que sejam detectados, ocorrendo nesse mesmo período casos de viremia, doença ou soroconversão de hospedeiros. Isso significa que o vírus persiste de uma estação de atividade do vetor para outra, passando pelo período em que as condições climáticas não permitem a sobrevivência e atividade de *Culicoides* adultos. Esse mecanismo foi denominado de “overwintering” (EMBRAPA, 2006).

3.3. Genoma do vírus da língua azul e características moleculares

O genoma do VLA consiste de 10 segmentos de RNA fita dupla (RNAds), dividido em três segmentos grandes (L1 a L3), três médios (M4 a M6) e quatro pequenos (S7 a S10). Estes 10 segmentos do RNA de fita dupla variam de 3954 a 822 pb. O conjunto de segmentos genômicos são responsáveis pela codificação de proteínas estruturais (VP1 a VP7) e as cinco proteínas não estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3a, NS4 e S10-ORF2), as quais são numeradas de acordo com a sua migração eletroforética em agarose a 1% , conforme Figura 2 , (ALFIERI et al., 2007).

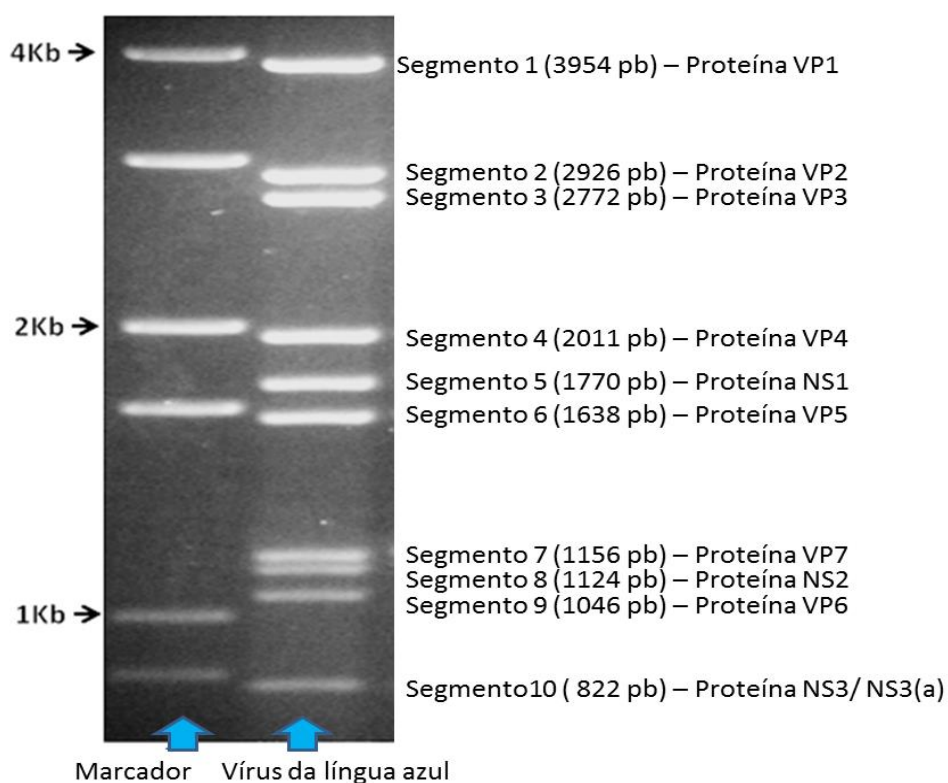


Figura 2 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) do dsRNA do VLA. Representação esquemática dos 10 segmentos lineares, organizados conforme seus respectivos pesos moleculares e respectivas proteínas.
Fonte: Maan et al., 2011.

As proteínas VP2 e VP5 são as menos conservadas entre as estirpes do vírus, conferindo elevada variabilidade genética ao VLA, a VP2 é o principal determinante da estirpe, sendo também responsável pelo estímulo para a produção de anticorpos neutralizantes (ICTV, 2016). Atualmente, por meio de testes moleculares e de soroneutralização, foram classificados e reconhecidos 27 sorotipos, contudo, há o possível acréscimo de outros dois novos sorotipos, o sorotipo 28, isolado a partir de amostras de ovelhas provenientes do Oriente Médio, e do sorotipo 29, isolado a partir de amostras ovinos da África do Sul, (MAAN et al., 2011; 2015; 2016). Também foram identificados recentemente na China e na Itália, possíveis novos sorotipos do VLA, ambos geneticamente semelhantes aos sorotipos BTV-25 (*Toggenburg Orbivirus*, isolado na Suíça) (HOFMANN et al., 2012), BTV-26 (isolado no Kuwait) (MAAN et al., 2011) e BTV-27, porém ainda não totalmente caracterizados (SPERLOVA; ZENDULKOVA, 2011; MAAN et al., 2011; ZIENTARA et al., 2014; PULLINGER et al., 2016; SUN et al., 2016; LORUSSO et al., 2016).

Conforme descrito na Tabela 1, o segmento 1 codifica a polimerase viral (VP-1), que é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela síntese de todos os RNA

virais que atuarão como RNA mensageiros (mRNA) na tradução das diferentes proteínas do vírus. Além da RdRp, o VLA codifica duas outras proteínas com propriedades enzimáticas: VP-4 (codificada pelo segmento 4), que tem a função de adicionar o “cap” nos terminais 5’ dos RNA virais; e VP-6 (codificada pelo segmento 9) com a função de helicase (MAAN et al., 2007).

O segmento 2 (Seg-2) é o responsável por codificar a proteína VP-2, que associada com a proteína VP-5, codificada pelo segmento 6 (Seg-6), formam o capsídeo externo do vírus. A VP-2 tem como principal função o reconhecimento de receptores na membrana da célula hospedeira, enquanto VP-5 é uma proteína responsável pela fusão que media a penetração do vírus na célula hospedeira. Os estudos de análises filogenéticas realizados mostraram que os segmentos 2 e 6 do genoma do VLA, são os segmentos com maior variabilidade genética. As sequências de nucleotídeos do segmento 2 de isolados do VLA permitem a formação de diferentes grupos ou clados, conforme a variabilidade genética apresentada entre os sorotipos, sendo o segmento 2 o principal segmento utilizado para identificar e classificar os isolados virais e o determinante na identificação dos diferentes sorotipos, pois contém a maioria dos antígenos neutralizadores virais que possibilitam a identificação de populações de vírus geneticamente muito semelhantes (MAAN et al., 2007).

Um dos mecanismos relacionados à variabilidade genética dos reovírus é o processo conhecido por rearranjo “reassortment”, que consiste na troca de segmentos genômicos, comum em células infectadas por um ou mais vírus relacionados. O rearranjo de genomas, normalmente, determina o surgimento de estirpes de uma mesma espécie dentro de cada gênero da família *Reoviridae* (MERTENS et al., 2008).

A análise filogenética do segmento 2, com base nas sequências de nucleotídeos da proteína VP2, possibilitou analisar os diferentes sorotipos do VLA, bem como seus agrupamentos em clados, determinando diferentes sorogrupos. Foi possível observar que sorotipos do VLA pertencentes ao mesmo sorogrupo apresentam identidade de sequência de nucleotídeos superior a 66,9%. Conforme as similaridades entre os 27 sorotipos, formou-se 12 diferentes sorogrupos classificados de A – L, para os 27 sorotipos do VLA (Figura 3). O sorogrupo “A” que compreende os sorotipos BTV-4, BTV-10, BTV-11, BTV-17, BTV-20 e BTV-24; o sorogrupo “B” que compreende os sorotipos BTV-3, BTV-13 e BTV-16; o sorogrupo “C” que inclui os sorotipos BTV-6, BTV-14 e BTV -21); o sorogrupo “D” com os sorotipos BTV-8, BTV -18 e BTV-23; o sorogrupo “E” como os sorotipos BTV-5 e BTV-9; o sorogrupo “F” com os sorotipos BTV-7 e BTV-19; o sorogrupo “G” com os sorotipos BTV-

12 e BTV-22; o sorogrupo “H” formado apenas pelo BTV-1; o sorogrupo “I” formado apenas pelo sorotipo, BTV-2; o sorogrupo “J”, também formado por apenas um sorotipo, o BTV-15; o sorogrupo “K”, formado pelo BTV-25 e BTV-27, e por fim, o sorotipo “L” compreendendo o BTV-26 (MAAN et al., 2011). Mesmo classificados em 12 sorogrupos distintos, os sorotipos que fazem parte de um mesmo sorogrupo podem apresentar reações cruzadas em testes sorológicos, dificultando a interpretação do resultado.

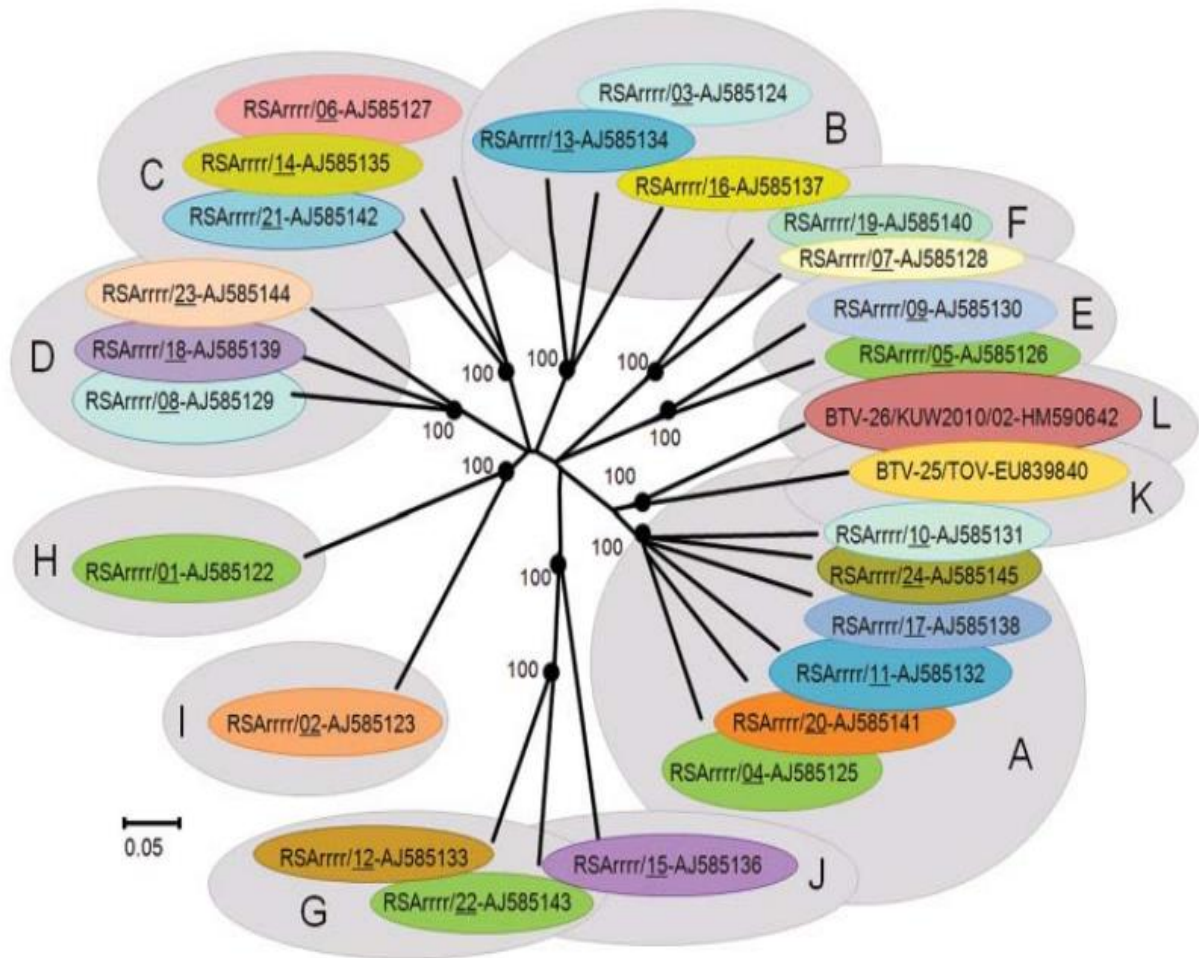


Figura 3 - Árvore filogenética construída utilizando o modelo matemático Neighbour-joining tree, a partir do alinhamento das seqüências do Seg-2 de diferentes sorotipos de referência isolados do VLA, BTV-1w, 4w, 8w e 16w provenientes de Omã. A árvore foi construída utilizando matrizes de distância gerada, e o algoritmo p-distância usando foi determinado pelo MEGA5 (“bootstrap” de 500 réplicas). O VLA foi dividido em 26 grupos distintos com base nas seqüências de Seg-2, refletindo relações sorológicas entre sorotipos de vírus. Fonte: Maan et al. 2011.

O capsídeo interno e o capsídeo intermediário são formados por proteínas mais conservadas, quando comparadas às proteínas do capsídeo externo (VP-2 e VP-5). As proteínas dos capsídeos interno e intermediário são, respectivamente, a VP-3 (codificada pelo segmento 3) e a VP-7 (codificada pelo segmento 7). A proteína VP-7 tem sido utilizada como

alvo para testes de diagnóstico específicos para o VLA, pois o segmento 3 é conservado, assim, podendo ser usado como alvo para a detecção das diferentes espécies do gênero *Orbivirus* (ATTOUI et al., 2005; 2009). O gênero *Orbivirus*, compreende atualmente 12 diferentes sorogrupos, os quais são demonstrados na Figura 3.

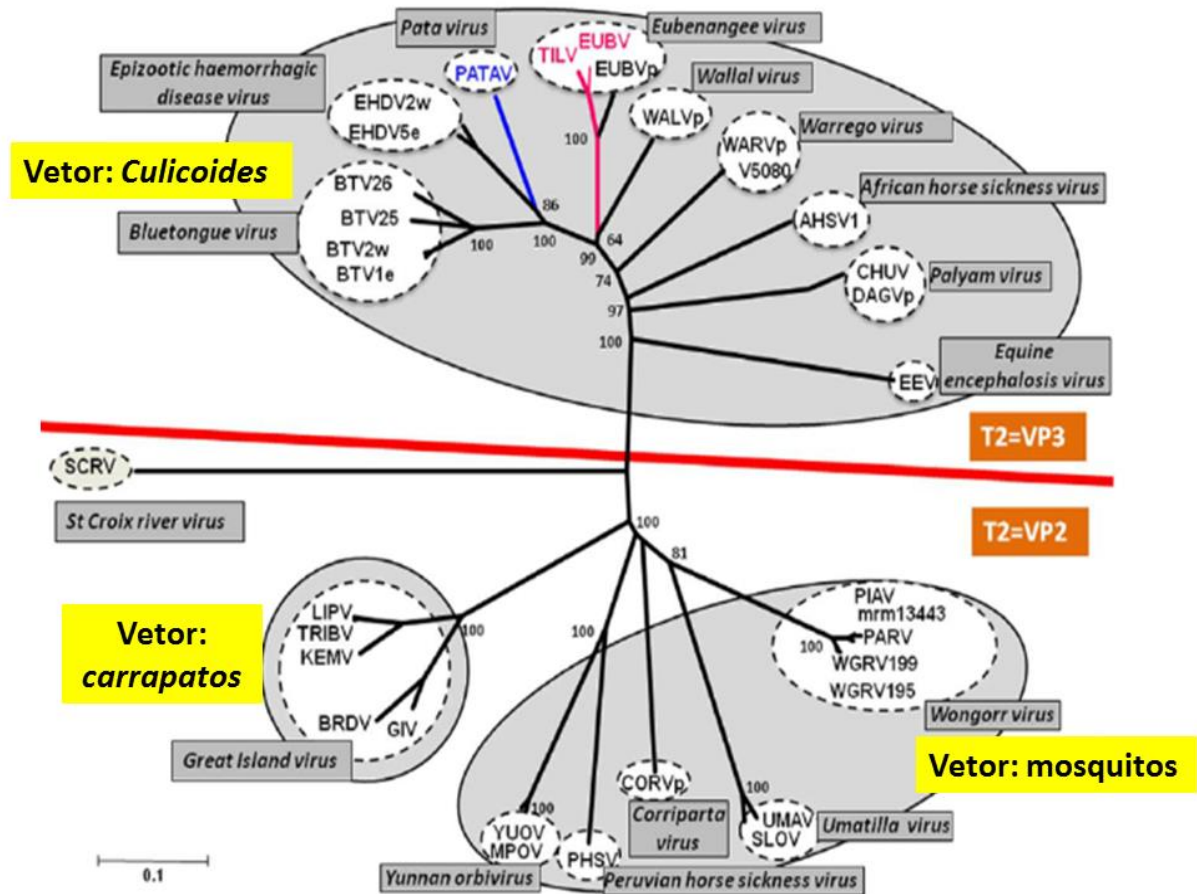


Figura 4 – Árvore filogenética de comparação dos outros sorogrupos do gênero *Orbivirus*, através das proteínas T2. Esta proteína é equivalente à proteína VP3 do VLA. A árvore foi construída pelo algoritmo Neighbor-joining, com matrizes de distância calculada usando o algoritmo de determinação de distância p, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas.

Fonte: Belaganahalli et al. (2012) .

As proteínas não estruturais identificadas do VLA (também descritas na Tabela 2) são: NS1, com 644 kDa, codificada pelo segmento 5 (Seg-5), relacionada à formação de túbulos; NS2, com 409 kDa, codificada pelo segmento 8 (Seg-8), está relacionada à matriz dos corpos de inclusão; NS3/NS3a, com 256 kDa, codificada pelo segmento 10 (Seg-10), está relacionada com a saída do vírus da célula; e as proteínas NS4 (codificada pelo segmento 9) e S10-ORF2 (ROY, 1992; FIRTH, 2008). Na Figura 2, podem ser observados, respectivamente, os 10 segmentos genômicos e as proteínas codificadas do VLA. Nas tabelas 1 e 2, estão relacionadas as características dos 10 segmentos do RNA genômico e das proteínas do VLA.

A maioria dos sorogrupos são imunologicamente distintos, entretanto, existe reação cruzada entre o VLA e os sorogrupos do vírus da doença epizoótica hemorrágica dos cervídeos e da peste equina (MAAN et al., 2011).

Tabela 1 - Descrição das proteínas estruturais do VLA de acordo com o segmento, nomenclatura, localização e função.

Segmento Genômico	Tamanho (pb)	Proteína	Peso molecular (Da)	Localização	Função proteica
1	3954	VP-1 (Pol)	149	Dentro do subcore e do eixo de dobragem	Função de RNA polimerase e RNA dependente.
2	2926	VP-2	111	Capsídeo externo	Responsável pela ligação e penetração celular em mamíferos e pela produção de anticorpos neutralizantes. É a proteína mais variável, responsável pela determinação do sorotipo e da virulência.
3	2770	VP-3 (T2)	103	Subnúcleo e Camada do capsídeo interno	Estruturar a organização física do genoma, formar estruturas para deposição dos trímeros do Segmento VP7. A VP3 mantém a simetria icosaédrica por controlar o tamanho e organização das estruturas do capsídeo e da ligação com RNA.
4	2011	VP-4 (Cap)	764	Dentro do subnúcleo (core)	Função de equilíbrio enzimático de guaniltransferase e metiltransferase, enzimas que adicionam o cap.
6	1638	VP-5	591	Camada interna do capsídeo externo	É uma proteína variável que faz fusão com a membrana, determinante da estirpe viral e penetração celular no início da infecção. Possui camada glicosilada que ajuda na determinação do sorotipo viral.
7	1156	VP-7 (T13)	385	Capsídeo intermediário	Ligação à ssRNA, dsRNA, helicase e ATPase. Proteína que constitui a superfície exterior do núcleo viral, envolvida na invasão celular, no aumento do potencial de infecciosidade no núcleo celular do inseto vetor e reage com os anticorpos.
9	1046	VP-6 (Hel)	357	Subnúcleo	Determinar o sorogrupo e penetração em células de insetos.

Fonte: Adaptado de Mertens; Attoui; Houssam, 2013 e atualizada.

Tabela 2 - Descrição das proteínas não estruturais do VLA de acordo com o segmento, nomenclatura, localização e função.

Segmento Genômico	Tamanho (pb)	Proteína	Peso molecular (Da)	Localização	Função e propriedades
5	1770	NS1 (TuP)	644	Citoplasma - túbulos	Responsável pela formação dos túbulos no citoplasma da célula, sendo estes túbulos, uma característica da replicação dos <i>Orbivirus</i> .
8	1124	NS2 (VIP)	409	Citoplasma, corpos de inclusão viral	Responsável pela formação de corpúsculo de inclusão viral, ligação ao RNA de fita simples.
10	822	NS3 - NS3a	256	Membranas celulares	Auxilia no regresso das partículas víricas e na determinação da virulência

Fonte: Adaptado de Mertens; Attoui; Houssam, 2013 e atualizada.

3.4. Hospedeiros

3.4.1 Ruminantes

Os ruminantes, sejam domésticos ou selvagens, são os mais suscetíveis à infecção pelo VLA. Ovinos e cervídeos são as espécies que normalmente apresentam lesões mais graves (COSTA et al., 2006), embora haja diferenças em relação à condição imune dos animais e da raça, sendo mais suscetíveis raças de lã fina e de corte (PURSE et al., 2005). A LA pode apresentar, desde manifestações subclínicas (assintomáticas) a casos fatais, dependendo do sorotipo, estirpe viral, espécie e idade do animal infectado (ELBERS et al., 2008).

Os sinais clínicos mais severos da doença são observados em animais selvagens, e mais comumente observados em ovelhas e em veados da América do Norte (*Odocoileus virginianus*), embora possam também ser observados em outras espécies de ruminantes (HOWERTH et al., 1988; DARPEL et al., 2007). No Brasil, os primeiros trabalhos publicados relatando cervídeos com sinais clínicos e lesões sugestivas de doenças hemorrágicas (LA, doença epizootica hemorrágica e doença hemorrágica por adenovírus), foram publicados na década de 90, porém sem diagnóstico de agente etiológico envolvido (DUARTE; ARITA, 1992; MORATO et al., 1993; ARITA et al., 1997). As doenças hemorrágicas têm sido importantes enfermidades observadas em cervídeos de cativeiro no Brasil, se apresentam de forma sazonal, em estações úmidas e quentes, atingindo cerca de 40% do rebanho e levando à morte de animais (ARITA et al., 1997). O VLA já foi descrito em cervídeos brasileiros do criatório científico do NUPECCE (DUARTE; ARITA, 1992; KAWANAMI, 2012; 2016), também começou a ser relatada em zoológicos e outros criatórios (MORATO et al., 1993).

Estudos realizados constataram a alta susceptibilidade de praticamente todas as raças ovinas à infecção pelo VLA, com algumas variações quanto à intensidade da doença, e aparecimento dos sinais clínicos, sendo estes mais frequentemente observados em raças exóticas quando introduzidas em regiões tropicais ou em rebanhos nativos localizados próximos a áreas consideradas endêmicas (LAENDER, 2002). No Brasil, a doença já foi relatada com maior severidade nas raças de ovinos Lacaune, Texel, Hampshire Down, Corriedale e Santa Inês (ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014; LIMA 2013). Na América do Sul, raças nativas de ovinos são suspeitas de possuírem alta prevalência de

anticorpos, apesar de aparentarem resistência à LA (CLAVIJO et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2008, VENDITTI, 2009.).

Apesar dos bovinos e caprinos serem infectados pelo VLA, raramente desenvolvem a doença, geralmente caracterizada por uma viremia prolongada que pode durar até 60 dias (OIE, 2016), e por uma doença branda ou assintomática.

Entretanto, em epidemias causadas pelo BTV-8 na Europa, foram observadas várias manifestações clínicas da doença em bovinos, sendo essas associadas principalmente a alterações reprodutivas (WILSON; MELLOR, 2009).

Nos bovinos, assim como nas demais espécies de ruminantes, os fatores de susceptibilidade, tais como condições imunológicas e sanitárias, raça, idade, sexo, sorotipo e virulência vão determinar a severidade da infecção pelo VLA (GONZÁLEZ et al., 2000). Segundo González et al., (2000), bovinos das raças de *Bos taurus* são mais suscetíveis à infecção pelo VLA do que os das raças de *Bos indicus*, e que, por outro lado, bovinos das raças de *Bos indicus* apresentam maior suscetibilidade do que indivíduos provenientes de cruzamentos entre as espécies. Em diversos estudos, tem sido observado que a soroprevalência da LA aumenta com a idade, sendo provavelmente um reflexo do maior tempo de exposição ao vetor e, conseqüentemente, ao vírus (WARD et al., 1994; GONZÁLEZ et al., 2000).

Nos rebanhos brasileiros, os bovinos infectados raramente apresentam sintomatologia clínica após a infecção (LOBATO, 1999). Devido a essas características, os bovinos atuam como reservatórios da LA, a partir dos quais os vetores podem se contaminar e transmitir o vírus a outros ruminantes, como os ovinos e cervídeos (GORCHS; LAGER, 2001; LIMA 2013).

3.4.2 Carnívoros e demais espécies

Estudos já demonstraram infecção pelo VLA em algumas espécies de carnívoros (AKITA et al., 1994; ALEXANDER et al., 1994; EVERMANN et al., 1994; Howerth et al., 1995; SEKI et al., 2003; OURA et al., 2011), sendo demonstrado uma maior ocorrência em cães domésticos. Nos Estados Unidos, durante os períodos de novembro de 2011 e setembro de 2012, três fetos caninos abortados foram enviados ao Centro de Diagnóstico de Saúde Animal da Universidade de Cornell para a realização de exames diagnósticos visando determinar as causas das dificuldades reprodutivas. O teste de isolamento viral a partir de

amostras de tecidos fetais identificou um agente citopatogênico em culturas de células, e os ensaios de anticorpos fluorescentes nas células infectadas foram positivos para o VLA. Subsequentemente, realizou-se a RT-PCR sorotipo-específica, identificando o sorotipo BTV-11. Nestes casos, os cães não tiveram contato com vacinas contaminadas ou possuíam uma dieta de carne crua (DUBOVI et al., 2013).

Segundo Oura et al. (2011), a importância dos cães domésticos na propagação de longa distância do VLA permanece não comprovada. Sabe-se atualmente que os cães são capazes de ser infectados pelo VLA, produzindo resposta imune para o vírus e, em alguns casos, morrem mostrando sinais clínicos graves de doença. Atualmente, acredita-se que a infecção em cães possa ocorrer também por ingestão de carne infectada, sem que haja a presença de vetores competentes (OURA et al., 2011; DUBOVI et al., 2013). Estudos realizados com cães domésticos no Marrocos demonstraram uma alta porcentagem (21%), de cães soropositivos para VLA, todos os cães que fizeram parte deste estudo se alimentavam de rações comerciais e não tinham acesso a outros produtos cárneos (OURA et al., 2011).

A capacidade de infecção do agente não foi demonstrada em humanos, suínos e equinos (WILSON; MELLOR, 2008),

3.5. Principais vetores relacionados à transmissão do VLA

O VLA é transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*, que constituem um gênero de dípteros hematófagos pertencentes à família Ceratopogonidae (Diptera, Nematocera). Possuem pequenas dimensões, que variam entre 1-6 mm de comprimento. Os *Culicoides* atuam como vetores do VLA, pois ao praticarem a hematofagia, podem funcionar como vetores de várias espécies de patógenos (COSTA, et al., 2013). Estão amplamente distribuídos em todos os continentes, e são popularmente conhecidos como mosquito-pólvora, maruim, borrachudo, ou mosquito-do-mangue (Figura 5), que atuam como vetores biológicos do vírus (BORKENT, WIRTH, 1997; MELLOR, 2000; LAENDER et al., 2004).



Figura 5 - Quatro exemplares de *Culicoides imicola*
 Fonte: Rijt et al. (2008).

A família Ceratopogonidae possui cinco subfamílias conhecidas e 116 gêneros catalogados no mundo. Desses, destaca-se o gênero *Culicoides Latreille*, um grupo cosmopolita (ausente apenas na Antártica e na Nova Zelândia), formalmente descritas e distribuídas no mundo, das quais pelo menos 266 espécies ocorrem na Região Neotropical (BORKENT, 2007; BORKENT, 2012).

Este gênero é bastante diversificado, contendo cerca de 5.978 espécies descritas no mundo (BORKENT, 2012), contudo, apenas cerca de 50 espécies são consideradas vetores competentes. Desses, 17 estão relacionadas diretamente com a transmissão do VLA (BORKENT; WIRTH, 1997). Atualmente, a principal espécie transmissora do VLA é o *C. imicola* (Figura 5), sendo considerado o vetor mais eficiente nos continentes Europeu, Africano e Asiático. A espécie foi descrita como vetor competente nos casos de LA ocorridos em Portugal, Espanha, Grécia, Chipre, Itália, Israel, Turquia, entre outros países (MELLOR, 1990). As espécies como *C. obsoletus* e *C. pulicaris* apresentam potencial de transmissão na Europa (MEHLHORN et al., 2009). Outras importantes espécies transmissoras são *C. actoni* Smith e *C. fulvus* Sen & Das Gupta (Austrália, leste e sudeste da Ásia), *C. brevitarsis* Kieffer e *C. wadai* Kitaoka (Austrália e sudeste da Ásia) e *C. imicola* Kieffer (África, países do Mediterrâneo, sul e leste da Ásia). Na América do Norte o principal vetor é o *C. varripennis* (Coquillet) (DANIELS et al., 1995). Na América Central e América do Sul, *C. insignis* Lutz e *C. pusillus* Lutz, parecem ser os principais vetores da LA (WIRTH; DYCE; SPINELLI, 1985;

SAENZ; GREINER, 1994), sendo que os sorotipos BTV-2, BTV-3 e BTV-6 já foram detectados e isolados a partir de *C. insignis*, e os sorotipos BTV-3 e BTV-4 a partir do *C. pusillus* (GREINER et al., 1985; KRAMER; GREINER; GIBBS, 1985; MO et al., 1994). Ainda na América Central e Caribe, segundo Mo et al. (1994), o *C. insignis* foi a espécie predominante (95%) nas coletas realizadas, onde as armadilhas de captura estavam próximas de criações de ruminantes, sendo isolados os sorotipos BTV-3 e BTV-6 (MO et al., 1994). Pesquisas realizadas na Argentina e no Paraguai identificaram 21 espécies de *Culicoides*, evidenciando a maior ocorrência do *C. insignis* (RONDEROS et al., 2003).

Os primeiros trabalhos de identificação desses dípteros no Brasil foram realizados na década de 60 por Forattini. Recentemente, a identificação de *Culicoides* da fauna brasileira tem sido realizada nos seguintes Estados brasileiros: Minas Gerais (LAENDER et al., 2004), Acre (FELIPPE-BAUER et al., 2000), Amapá (SARAIVA et al., 2011), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2001), Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997), Pará (TRINDADE; GORAYEB, 2005), Amazonas (FELIPPE-BAUER et al., 2008), e Maranhão (BARROS et al., 2007). Entretanto, a fauna de *Culicoides* no Brasil ainda é pouco estudada, sendo necessários outros estudos demonstrando a presença desses mosquitos nos focos epidemiológicos da infecção pelo VLA. Por serem pouco estudadas, não se sabe sobre a competência destes em transmitir o vírus, quando comparadas com outros grupos de insetos vetores, sendo poucas as Unidades Federativas com registros taxonômicos (PINHEIROS; ROSA; VASCONCELOS, 1997; BARROS et al., 2007; FELIPPE-BAUER et al., 2008).

No Brasil, são conhecidas pelo menos 103 espécies, das quais 82 ocorrem na Amazônia brasileira (FELIPPE-BAUER et al., 2009; BORKENT et al., 2007; FELIPPE-BAUER et al., 2001; FELIPPE-BAUER et al., 2000), sendo que a maioria dos levantamentos entomológicos desse gênero foram realizados nos Estados do Amazonas (VERAS et al., 1998; CASTELLÓN et al., 1993; CASTELLÓN et al., 1991; CASTELLÓN, 1990) e Pará (TRINDADE et al., 2010; SILVA et al., 2010; SANTARÉM et al., 2010; TRINDADE et al., 2005).

Estudos dessa natureza em outras regiões do Brasil ainda são poucos, tendo-se conhecimento dos inquéritos entomológicos realizados nos Estados de Minas Gerais (LAENDER et al., 2010) e Rio de Janeiro, onde já foi registrada a ocorrência de pelo menos 25 espécies (SILVA et al., 2001). No Maranhão, Silva e Rebêlo (1999) relataram a ocorrência de 15 espécies presentes na ilha de São Luís. Ainda no Estado do Maranhão, Costa et al., (2013), em estudo realizado em áreas rurais e urbanas do pólo turístico de Barreirinhas, na região do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, nos anos de 2004 a 2007, capturaram

7.964 insetos, de 13 espécies. As mais abundantes foram *Culicoides filariferus* (30,7%), *C. ignacioi* (24,6%), *C. insignis* (13,8%), *C. leopoldoi* (12,8%), *C. boliviensis* (9,9%), *C. foxi* (4%) e *C. paucienfuscatus* (3,2%). Costa et al. (2013), estudaram também a utilização de seres humanos e animais domésticos como hospedeiros sanguíneos, e constataram que os *Culicoides* sugaram sangue de mamíferos (54,3%, incluindo humanos, 11,2%) e aves (31,9%), sendo abundantes na zona rural, onde foram capturados, em média, 878,9 espécimes/localidade, contra 18 espécimes/localidade na zona urbana.

As espécies deste gênero são encontradas desde o nível do mar até 4.000 m de altitude, alimentando-se 96% delas do sangue de mamíferos e aves (MELLOR, 2000), podendo transmitir patógenos entre os vertebrados dos quais “sugam sangue”.

Os *Culicoides* estão frequentemente presentes em áreas quentes, úmidas e alagadas, que são ricas em matéria orgânica e abundantes em hospedeiros dos quais os insetos podem se alimentar. O período de atividade do vetor concentra-se cerca de uma hora antes do pôr do sol até uma hora depois do nascer do sol (MELLOR, 2000). O ciclo de vida desses insetos tem duração de duas a seis semanas, é direto e envolve fase de ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto. Em geral, as fêmeas de *Culicoides* precisam ingerir um repasto de sangue de três a quatro dias antes da postura dos ovos, com intervalo de quatro dias. Os machos apresentam características morfológicas distintas das fêmeas, e por possuírem aparelho bucal não apto a sugar sangue, sua alimentação é baseada em sucos vegetais, não sendo atraídos por animais (BIRLEY et al., 1982; MELLOR, 2000; LYSYK; DANYK, 2007; VERONESI et al., 2009).

Como toda doença cuja transmissão é dependente de vetores, a epidemiologia da LA consiste em uma interação complexa e dinâmica envolvendo o hospedeiro, as diferentes estirpes virais, os vetores, o clima e suas inter-relações (MELLOR, 1996).

Dessa forma, a distribuição do VLA está restrita às áreas onde estão presentes espécies competentes do vetor e número suficiente de hospedeiros susceptíveis, e a transmissão da doença está limitada ao período do ano em que as condições climáticas favorecem o aumento da população do vetor e a atividade (vôo e repasto sanguíneo) dos insetos adultos (WARD, 1994; WARD; THURMOND, 1995; MELLOR, 1996; WITTMANN; BAYLIS, 2000).

3.6. Transmissão

A principal forma de transmissão do VLA é através do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas dos mosquitos do gênero *Culicoides* (MELLOR et al, 2000). Contudo, para que

ocorra a transmissão viral, é essencial o período de viremia, uma vez que nessa fase da infecção o vírus encontra-se associado às células sanguíneas (principalmente monócitos, linfócitos e eritrócitos) (OSBURN, 1994a,b). Dessa forma, o ruminante virêmico serve como fonte de vírus para o vetor e atua como reservatório para a manutenção do vírus (BREARD et al., 2004). A duração da fase virêmica nas diferentes espécies animais tem uma relação direta com a importância de cada espécie na epidemiologia do vírus. Têm sido descritas viremias de aproximadamente 50 dias em ovinos e caprinos, de 28-41 dias em bisão e de mais de 100 dias em bovinos (KOUMBATI et al., 1999; TESSARO; CLAVIJO, 2001). Apesar da infecção do VLA ser inaparente nos bovinos e caprinos, esses animais são considerados um importante reservatório do vírus em virtude do longo período da fase virêmica e dos altos títulos virais durante esse período (WARD, 1994; WARD; THUMOND, 1995; BREARD et al., 2004).

3.6.1 Transmissão Clássica – Presença de Vetor Biológico

Os *Culicoides* se infectam com o VLA quando ingerem sangue de um hospedeiro em período de viremia (Figura 4). Apenas as fêmeas são hematófagas e para a conclusão de um ciclo ovariano, precisam de um repasto sanguíneo, sendo que o pico de atividade desses insetos está relacionado com seu ciclo reprodutivo. A alimentação ocorre preferencialmente nos períodos noturnos, e o vírus se replica no trato digestório e em órgãos alvo secundários, incluindo as glândulas salivares. O intervalo entre a ingestão e a habilidade subsequente para transmitir o vírus é chamado de período de incubação extrínseco e sua duração depende da temperatura do ambiente (sendo que as temperaturas consideradas ótimas para a atividade estão entre 13 e 35 °C), levando cerca de 10 dias a 25 °C (WELLBY et al., 1996). Quando estão em condições de temperaturas elevadas, diminuem o tempo necessário para a conclusão de um ciclo ovariano (WITTMANN; BAYLIS, 2000).

A incidência sazonal da LA é restrita às épocas do ano, nas quais as fêmeas adultas estão presentes (WITTMANN; BAYLIS, 2000). As fêmeas de *Culicoides* requerem pelo menos um repasto sanguíneo para a conclusão de um ciclo ovariano. Dessa forma, o pico de atividade desses insetos está relacionado com seu ciclo reprodutivo. Este fator é relevante na prevalência da doença, podendo o vírus ser transmitido a cada repasto para ruminantes susceptíveis, como representado na Figura 4 (MELLOR, 1990; WARD, 1994; LOBATO, 1999; WITTMANN; BAYLIS, 2000).

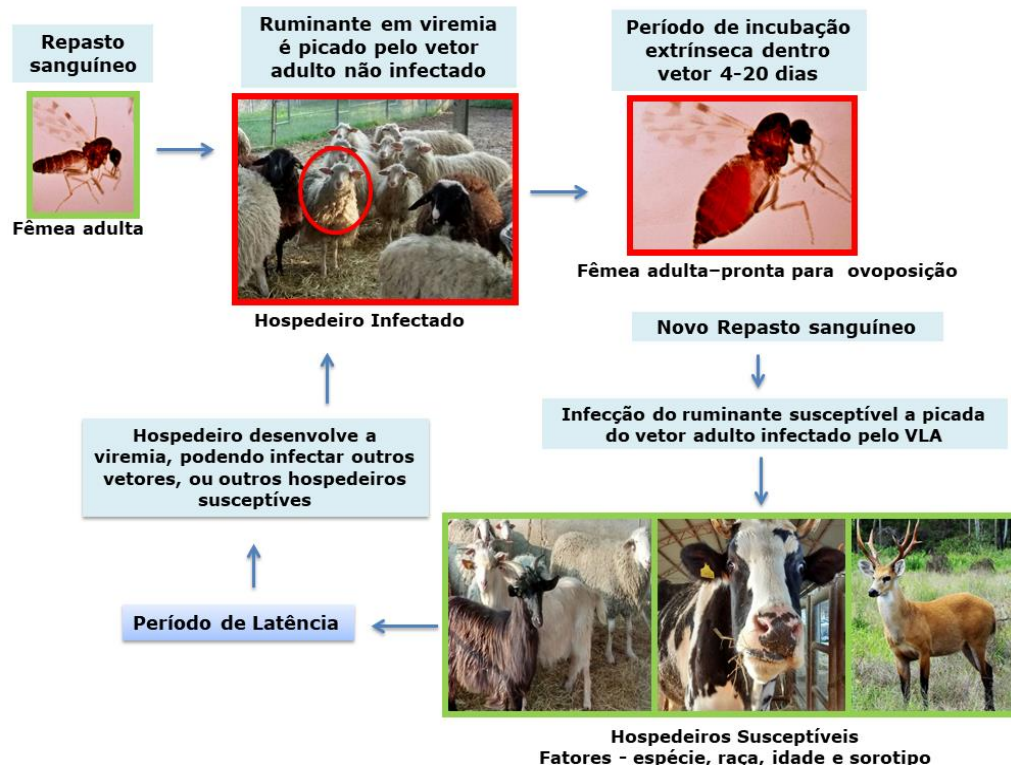


Figura 6 - Ciclo de transmissão clássica do vírus da língua azul.
Fonte: Lima, 2017.

Segundo Bayli et al. (2000), mesmo em espécies comprovadamente competentes a taxa de infecção dos mosquitos sugando animais virêmicos é bastante variada. Em alguns casos não atinge 20%, demonstrando que vários outros fatores estão envolvidos nessa competência.

Há relatos de disseminação do vetor pelo vento por até 100 km (HOCH; ROBERTS; PINHEIRO, 1990).

Várias espécies de *Culicoides* de comprovada competência na transmissão do VLA, como *C. brevitarsis*, *C. brevipalpis*, *C. wadai* e *C. fulvus*, se alimentam preferencialmente de sangue de bovinos (LOBATO, 1999).

3.6.2 Outras Formas de Transmissão

3.6.2.1 *Transmissão Transplacentária*

A transmissibilidade transplacentária depende do sorotipo, linhagem do vírus e estado imune da fêmea prenhe (DARPEL et al., 2009). Em ovinos, ocorre mais frequentemente no primeiro trimestre e em bovinos entre seis e 140 dias de gestação (DARPEL et al., 2009).

A transmissão transplacentária do VLA já foi descrita em diferentes espécies, em bovinos (THOMAS; RANDALL; MYERS, 1986; DESMECHT et al., 2008; DARPEL et al., 2009; WILSON et al., 2009; SANTMAN-BERENDS et al., 2010), em ovelhas (FLANANGAN; JOHNSON, 1995; SAEGERMAN et al., 2011; BALARO et al., 2014), em cabras (BELBIS et al., 2013) e em cães (WILBUR et al., 1994; DUBOVI et al., 2013).

A possibilidade de morte embrionária relacionada ao VLA tem sido reportada com base em estudos epidemiológicos, em que um aumento do intervalo entre partos (153 - 112 dias) e uma menor taxa de concepção no primeiro serviço foram associados à soroconversão e ao isolamento viral em animais prenhes (WRATHALL et al., 2006).

3.6.2.2 *Transmissão Venérea*

A transmissão venérea do VLA foi relatada em vacas susceptíveis contaminadas por sêmen infectado. Entretanto, a presença do vírus no sêmen de touros é restrita ao período virêmico, coincidindo normalmente com o pico da viremia (BOWEN et al., 1983; AFSHAR; EAGLESOME, 1990; OSBURN, 1994a,b; WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006). BOWEN; HOWARD; PICKETT (1985) inocularam o VLA em vinte touros com objetivo de estudar a frequência, duração e patogênese da eliminação viral, tendo sido isolado em 10,49% (19/181) dos ejaculados examinados durante o período de viremia e em nenhuma das 79 partidas após a viremia.

A presença do vírus no sêmen bovino levantou a possibilidade da transmissão venérea ser um fator epidemiologicamente importante para a doença, pois dessa forma o VLA se manteria de uma estação do vetor para a outra (“overwintering”) (BOWEN et al., 1983; WRATHALL et al., 2006). Este fato foi o principal norteador das imposições das barreiras internacionais para a comercialização de animais e seus germoplasmas, com relação à LA

(BOWEN et al., 1983; AFSHAR; EAGLESOME, 1990; WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006).

3.6.2.3 *Transmissão Vacinal*

A transmissão vacinal pode ocorrer pelo uso de vacinas vivas atenuadas compostas por sorotipos de VLA que possuem a característica congênita. Estes efeitos indesejáveis podem ocorrer devido à adaptação viral ao sistema no qual é produzida a massa antigênica para replicação do vírus, neste caso passagem em ovos embrionados (SAVINI, 2014). Portanto são fundamentais os testes prévios para liberação de vacinas seguras e quando necessário impedir o uso destas em fêmeas gestantes.

3.6.2.4 *Transmissão por contato*

A transmissão por contato do VLA, sorotipo 26 (BTV-26) foi evidenciada e descrita em cabras por Batten et al., (2014), que com objetivo de avaliar os mecanismos de transmissão do BTV-26, realizaram, um estudo prévio investigando também a patogenicidade e a cinética de infecção. Neste estudo, foi constatado que uma das cabras usada como controle negativo provavelmente tenha sido infectada através de uma via de transmissão de contato direto, uma vez que os animais estavam alojados em estábulos de segurança, sem a presença do vetor. Posteriormente, em estudo experimental, onde três cabras foram infectadas com BTV-26 e alojadas junto a outras três cabras, sem infecção, permitindo o contato direto, e outras quatro cabras mantidas em contato indireto, separadas de cabras infectadas por portões metálicos. A barreira permitia que as cabras tivessem contato ocasional cara a cara no mesmo espaço aéreo, mas a alimentação, água, colheita de amostras e limpeza das baias eram realizadas separadamente. As três cabras infectadas experimentalmente não apresentaram sinais clínicos da LA, no entanto, foram detectados altos níveis de RNA viral e o vírus foi isolado do sangue nos primeiros dias. Com 21 dias após infecção, o RNA viral foi detectado e o vírus foi isolado do sangue das três cabras que estavam em contato direto, que também soroconverteram, Enquanto que as quatro cabras mantidas em contato indireto não se infectaram (BATTEN et al., 2014).

Em outro experimento, também para avaliar a transmissibilidade do BTV-26, em *Culicoides*, mais de 300 *Culicoides sonorensis* foram alimentados com uma farinha de sangue

contaminada com o BTV-26 e incubados por sete dias. A disseminação de BTV-26 na espécie ocorreu de forma individual, e os resultados indicaram que nenhum dos insetos analisados no dia sete do experimento, possuíam potencial infectivo para transmitir o VLA BTV-26. Constatando-se que a linhagem do BTV-26, parece não se replicar em mosquitos *C. sonorensis* usando condições consideradas padrão para os demais sorotipos do VLA (BATTEN et al., 2014).

3.6.2.4 Transmissão oral e outras formas de transmissão mecânica

Evidências de transmissão oral foram descritas em carnívoros na África e durante o surto pelo VLA-8 na Europa (WILSON et al., 2000), mas esses mecanismos de transmissão são incomuns e não estão completamente elucidados.

A transmissão oral, apesar de ainda pouco estudada, foi descrita em casos de ingestão de placenta de um feto bovino infectado, e também pelo colostro (MENZIES et al., 2008; MAYO et al., 2010).

A transmissão mecânica também foi comprovada pelo piolho do ovino (*Melophagus ovinos*), pelo carrapato *Ornithodoros coriaceus* e por outros mosquitos (*Aedes lineatopennis* e *Anopheles vagus*). Entretanto, é improvável um maior significado desses vetores na epidemiologia da doença (RADOSTIS et al., 2002).

3.7 Fatores ambientais

Fatores ambientais, dentre os quais elevados índices de temperatura e umidade, são adequados para multiplicação do vetor, pois fazem com que ocorra a diminuição do tempo de eclosão dos ovos e de desenvolvimento das larvas (WITTMANN; BAYLIS, 2000). Além disso, esses fatores são fundamentais para o processo de transmissão viral, pois o aumento da população do vetor resulta no aumento da atividade (vôo e repasto sanguíneo) dos insetos (WARD, 1994; MELLOR, 1996).

A variação da temperatura provavelmente é o principal fator relacionado à oscilação populacional do vetor em curto prazo, pois favorece a reprodução do mesmo, entretanto, temperaturas excessivamente altas podem reduzir a sobrevivência dos vetores adultos, causando sua diminuição populacional em curto prazo (WARD; THURMOND, 1995).

A exposição de fases imaturas de espécies de *Culicoides* que não são vetores competentes à temperaturas próximas dos seus limites letais (33-35°C), pode resultar em adultos competentes para a transmissão do VLA (WITTMANN; BAYLIS, 2000).

O VLA depende dos mosquitos vetores para manter-se na natureza, sendo as condições de temperatura e umidade, na grande parte do Brasil, fatores que favorecem a multiplicação e manutenção dos insetos, facilitando a endemicidade da doença (LOBATO, 1996). As mudanças climáticas em regiões endêmicas, trânsito de animais, mudanças nas características pluviométricas e, principalmente, movimento dos ventos, podem trazer os vetores de regiões distantes para áreas livres da doença (LOBATO, 1999).

3.8 Patogênese do vírus da língua azul

O sítio primário da infecção pelo VLA são as células endoteliais do sistema vascular e células do sistema linforreticular. Após a primeira replicação nos gânglios linfáticos, o vírus se dissemina para outras regiões secundárias, principalmente pulmões, medula óssea, baço e linfonodos, onde se replica no endotélio e nos fagócitos mononucleares (BARRATT-BOYES; MACLACHLAN, 1994). A disseminação pode ser por meio dos vasos linfáticos e/ou vasos sanguíneos. Mediadores vasoativos produzidos por células reticulares dendríticas, macrófagos e células endoteliais infectadas pelo vírus contribuem para a extensiva disfunção endotelial e falência vascular, fenômeno característico da LA fulminante (PARSONSON, 1990; BREARD et al., 2004). O VLA pode ser detectado nos eritrócitos, nos quais ele não se replica, mas persiste em invaginações da membrana celular, permanecendo protegido do sistema imune. A associação do VLA com os eritrócitos é detectada logo após a infecção (em torno de 24 horas) e persiste durante toda a viremia. Conseqüentemente, a infecção nos ruminantes é caracterizada por uma viremia prolongada (KATZ et al., 1994).

A patogenia da infecção pelo VLA é similar em ovinos e bovinos, e muito provavelmente, em todas as espécies de ruminantes (LAENDER, 2002). Entretanto, existem diferenças na gravidade da doença em relação à espécie, raça e idade do animal infectado, condição imunológica do animal, sorotipo do vírus. Nos ovinos e em alguns cervídeos, a LA pode se apresentar como uma doença severa, caracterizada por lesões inflamatórias em tecidos vascularizados, como mucosas e bandas coronárias. Em contraste, nos bovinos, caprinos é geralmente caracterizada por uma viremia prolongada e por uma doença branda ou

assintomática, caracterizada por diarreia crônica, aborto e crescimento excessivo dos cascos (GIBBS; GREINER, 1994; MELLOR, 1996; LAENDER, 2002; BREARD et al., 2004).

Em vacas prenhes em início de gestação, a infecção pelo VLA pode ocasionar abortos, má formação congênita caracterizada por hidrocefalia, cegueira e deformações da mandíbula (RIET-CORREA et al., 1996; RADOSTIS et al., 2002). Entretanto, Radostis et al. (2002) citam que o vírus não-adaptado ao mecanismo de produção de massa antigênica no processo vacinal, não atravessa a placenta facilmente, sendo rara a ocorrência de defeitos congênitos com a infecção natural. Esses autores citam a observação de defeitos congênitos em ovelhas prenhes vacinadas com vacinas de vírus atenuado e em vacas prenhes inoculadas com linhagens mais virulentas.

A participação das diferentes linhagens do VLA no desenvolvimento da doença não está bem definida, mas existem claras diferenças na virulência entre elas. Mesmo quando uma linhagem geneticamente estável é detectada durante um surto epizootico, a heterogeneidade genética é facilmente detectada. Estas variações são consequência dos chamados “drift” antigênicos, determinados por mutações pontuais nos diferentes segmentos gênicos do VLA ou “shift” antigênicos, determinados por trocas ou recombinações entre diferentes vírus coinfectando uma célula. Logo, esta variabilidade genética do VLA reflete em diferenças nas propriedades fenotípicas de cada linhagem, incluindo sua virulência para determinadas espécies de ruminantes.

O exemplo claro, segundo Singer; Maclachalan; Carponter (2001) foi observado quando o sorotipo 4 do VLA praticamente não causou lesão entre os ruminantes das Américas, enquanto que as linhagens do mesmo sorotipo no Sul da África induziram 100% de mortalidade em ovinos experimentalmente inoculados. Portanto, nesse exemplo foi possível demonstrar que não só o sorotipo determina virulência, mas também mutações pontuais que modificam propriedades fenotípicas. Similarmente, embora a grande maioria das linhagens do VLA não cause doença em bovinos, especialmente em regiões enzoóticas, outras linhagens do VLA, como a da estirpe 8 que circulou na Europa podem produzir doença em muitas espécies, incluindo bovinos e ruminantes selvagens (MERTENS. 2008).

Os achados patológicos da LA estão associados à lesão no endotélio vascular decorrentes de alterações de permeabilidade e fragilidade dos capilares, com subsequente coagulação intravascular disseminada e necrose dos tecidos irrigados por esses capilares lesionados. Essas alterações resultam em trombose vascular, infarto, edema, congestão, hemorragia, inflamação, isquemia e necrose dos tecidos afetados (PARSONSON, 1990).

Microscopicamente, pode-se verificar infiltrado celular inflamatório mononuclear, vacuolização celular, estase sanguínea, hipertrofia das células endoteliais e fragmentação de vasos sanguíneos de pouco calibre (MICHELSEN, 1990).

3.9. Sinais clínicos

Os sinais clínicos da doença em ruminantes domésticos e selvagens variam desde subclínico a severos casos agudos. A ocorrência da doença clínica tem sido demonstrada, principalmente, nos ovinos e cervídeos (COSTA et al., 2006), podendo apresentar altos índices de mortalidade e diminuição na produção, resultando em prejuízos econômicos significativos (CEBRA, 2004; EMBRAPA 2006).

A LA, quando introduzida em rebanhos de ovinos altamente suscetíveis, pode apresentar morbidade de 50-75% (SINGER; MACLACHALAN, CARPENTER, 2001; MACLACHALAN et al., 2009), podendo chegar a 100% do rebanho afetado, dependendo do sorotipo envolvido, das condições do rebanho e dos fatores ambientais da região. Alguns estudos demonstram haver mortalidade em torno de 20-50% (SINGER; MACLACHALAN; CARPENTER, 2001; MACLACHALAN et al., 2009), dados corroborados pela OIE (2016) que relata a mortalidade de até 70% em rebanhos suscetíveis.

Em ovinos, os principais sinais clínicos observados são: edema da face, febre, corrimento nasal mucopurulento ou sanguinolento, crostas, salivação, hiperemia da mucosa oral e edema da língua, focinho, lábios e mucosa oral, e em casos severos, a língua fica cianótica. A hiperemia pode se estender a outras partes do corpo, particularmente virilha, axila e períneo. Hemorragia na porção coronária dos cascos é comum e está associada à degeneração muscular, levando à claudicação. Posteriormente, observam-se vesículas na boca e lábios, erosão e ulceração extensivas do trato gastrointestinal, localizadas principalmente nas faces laterais da língua, cianose da mucosa oral e nasal, diarreia que pode ser hemorrágica, dispneia, perda de lã, inflamação do rodete coronário, claudicação, degeneração da musculatura esquelética, anorexia, perda de peso, problemas reprodutivos e alterações na produção de lã (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 1994).

Alterações reprodutivas e malformações congênitas também são comuns. Adicionalmente, afecções na boca, casco e tetas podem ser confundidas com outras doenças, tais como febre aftosa, febre catarral maligna, estomatite vesicular, dermatite pustular

contagiosa, poxvirus, doença da fronteira, podridão das patas e actinobacilose, sendo portanto, o diagnóstico diferencial de fundamental importância (BRODIE et al., 1998).

No Brasil, raramente bovinos infectados apresentam manifestações clínicas após a infecção (LOBATO, 1999). Quando se observam sinais clínicos nos bovinos, estes são menos graves do que nos ovinos e se caracterizam por febre, salivação, edema dos lábios, corrimento nasal com lesões ulcerativas da língua e cavidade oral. Devido a doença apresentar pápulas e ulcerações na boca e cascos, está incluída na lista de doenças diferenciais de febre aftosa (RIET-CORREA et al., 1996). Infecção aguda em touros é associada com infertilidade transitória (OSBURN, 1994b). LAENDER (2002) menciona a seguinte disposição de sinais clínicos mais frequentemente registrados em surtos de LA em bovinos: manqueira, febre, focinho com secreções ou crostas, salivação excessiva, hiperemia ou cianose nos lábios, língua ou focinho, queda na produção de leite, lacrimejamento, hiperemia podal, edema nas patas, úlceras podais, pêlos secos, alopecia, feridas nas tetas, olhos hiperêmicos ou inflamados, tetas hiperêmicas, olhos manchados ou ulcerados, edema na língua, desprendimento dos cascos, diarreia crônica. Além de aborto, a infecção em vacas prenhes em início de gestação pode levar à má formação congênita, caracterizada por hidrocefalia, microcefalia, cegueira e deformações da mandíbula (GIBBS; GREINER, 1994).

3.10. Epidemiologia

A distribuição do VLA é global, onde o mesmo já foi isolado e caracterizado em todos os continentes, exceto a Antártida (GIBBS; GREINER; 1994; TABACHNICK, 2004; MACLACHLAN, 2010). Sua distribuição está situada entre as latitudes de aproximadamente 53°N e 34°S incluindo desde 2006, a recente expansão mais ao norte da Europa atingindo todas as áreas com expressiva população de ruminantes (OIE, 2016).

O papel dos insetos na epidemiologia da LA é tão importante, que a doença é regida por fatores ecológicos que favorecem a sobrevivência dos insetos vetores, como temperatura, umidade e características de solo. Segundo Maan et al (2007; 2010), diferentes sorotipos podem ser perpetuados dentro de ecossistemas diversos e em regiões geográficas distintas por diferentes espécies de vetores, induzindo à variações como sucessivos rearranjos no genoma viral. Estudos moleculares realizados com todos os 10 segmentos do genoma viral, em diferentes isolados e de diversas regiões onde ocorreu a doença, mostraram significativas variações nas sequências de nucleotídeos, que parcialmente se correlacionam com as origens

geográficas do vírus, evidenciando a pressão de seleção dos fatores ambientais e ecológicos de cada região, bem como o surgimento de gerações de linhagens do VLA geograficamente distintas (MAAN et al., 2007; 2010).

A classificação epidemiológica do VLA é baseada na distribuição dos vetores e nas condições climáticas e ambientais, sendo classificadas mundialmente em zona endêmica, zona epidêmica e zona incursiva, assim divididas conforme a epidemiologia da doença (LOBATO et al., 2015).

- Na zona endêmica, a infecção dos ruminantes pelo VLA é comum e a doença clínica é incomum, ocorrendo quando há novas linhagens ou novos sorotipos, ou ainda quando ruminantes susceptíveis (trazidos de locais onde a infecção não é comum) são introduzidos na região;
- Na zona epidêmica, a infecção e a doença clínica ocorrem em alguns períodos do ano, tendo um caráter focal, com surtos ocorrendo quando as condições climáticas favorecem a disseminação do vetor além de suas fronteiras comuns e ruminantes susceptíveis são infectados;
- As condições climáticas na zona incursiva não favorecem a reprodução dos *Culicoides*, impedindo a perpetuação do vírus em um longo prazo (EMBRAPA, 2006). Desta forma, os surtos que ocorrem nessa região estão relacionados, geralmente, ao carreamento do vetor infectado por meio do vento e subsequente reprodução durante o verão, desaparecendo no outono e inverno (GIBBS; GREINER, 1994; RADOSTIS et al., 2002; OSBURN, 2004).

Surto da doença ocorrem tipicamente quando ovinos susceptíveis são introduzidos em área endêmica ou quando mosquitos carregam o vírus de uma região endêmica para áreas adjacentes contendo populações de ovinos susceptíveis (EMBRAPA, 2006).

Em países onde a doença é incomum, normalmente uma única estirpe é encontrada em um surto, porém em áreas onde a doença é comum, podem ser encontradas diferentes estirpes em um mesmo surto (GIBBS; GREINER, 1994; OSBURN, 1994a; BREARD et al., 2004; ARADAIB et al., 2005).

A LA é um problema crescente para a Europa, onde a União Europeia (EU) tem financiado programas de vacinação contra a doença, além de tomar várias outras medidas de controle. Desde 1998, a Europa tem sofrido com o surgimento de distintas estirpes e de novos sorotipos do VLA (BTV-1, BTV-2, BTV-4, BTV-8, BTV-9, e BTV-16), resultando na morte de mais de 1,8 milhões de animais (MERTENS; ATTOUI; MELLOR, 2008).

O BTV-8 foi detectado nos Países Baixos em agosto de 2006, sendo o causador de uma das maiores epidemias no norte da Europa, antes de se propagar na Alemanha, Bélgica e nordeste da França, gerando um total de 2.297 casos da doença no norte da Europa durante todo o ano de 2006. No ano de 2007, a Europa apresentou um total de 40.931 casos (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008). Mais tarde, o sorotipo 8 se espalhou pela Grã-Bretanha, Suíça, Dinamarca e República Checa (SAEGERMAN; BERKVENS; MELLOR, 2008; SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008; HENDRICKX, 2009).

Estudos realizados por Maclachlan (2010) demonstraram que a estirpe do BTV-8 que invadiu o norte da Europa apresentava alta virulência, além de características distintas das estirpes de campo do VLA já relatadas em surtos anteriores, como por exemplo, a manifestação de sinais clínicos severos não apenas em ovelhas, mas também em bovinos, e relacionados a casos de transmissão transplacentária (MACLACHLAN, 2010).

Na França, a propagação do BTV-8 foi notificada em 15.253 animais, apenas no sul do país a doença não foi detectada. A LA também reapareceu em 2007, na Bélgica (6.661 casos), Alemanha (11.487 casos) e nos Países Baixos (5.798 casos), e se propagou para o Luxemburgo (1.315 casos), Dinamarca (01 caso), Suíça (05 casos) e Reino Unido (65 casos). No ano de 2007, um número significativo de animais infectados com BTV-8 de origem africana foi importado para a Itália. Em janeiro de 2008, animais infectados foram detectados na Espanha e também na Irlanda do Norte, e o surto foi rapidamente contido pelo abate de todos os infectados e seus contactantes (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008).

Em 2008, o BTV-6 foi identificado na Holanda e na Alemanha, e o BTV-11 na Bélgica. Confirmou-se que ambos os sorotipos foram derivados de estirpes vacinais (DE CLERCQ et al., 2009; ESCHBAUMER et al., 2010), provavelmente introduzidas na Europa por meio do uso ilegal de vacinas atenuadas (MACLACHLAN, 2010).

Novos surtos de LA foram relatados também na Hungria, Áustria, Suécia e Noruega em 2008 e 2009 (CARPENTER; WILSON; MELLOR, 2009; AGREN et al., 2010; KAMPEN; WERNER, 2010; LEWERIN et al., 2010).

Segundo Lorusso et al. (2013), a proximidade geográfica da Itália com a África, especificamente na região da Sardenha, região onde já foram identificadas epidemias envolvendo os sorotipos do BTV-1, BTV-2, BTV-4, BTV-8 e BTV-16, e re-infeções causadas pelo BTV1 e BTV4, seria um fator importante, pois facilitaria a invasão de novos sorotipos ou novas estirpes do VLA na região. Estudos filogenéticos foram realizados nas amostras isoladas durante o ano de 2012, período em que ocorreram as re-infeções, e os resultados

evidenciaram que o sorotipo BTV-4, envolvido no surto, tinha origem de uma recombinação do sorotipo BTV-1, sendo que o BTV-4 recombinado era o mesmo circulante no norte da África (LORUSSO et al., 2013).

Considerado um país endêmico para a LA, a Índia possui isolado e caracterizados 13 diferentes sorotipos do VLA (BTV-1, BTV-2, BTV-3, BTV-4, BTV-6, BTV-9, BTV-10, BTV-12, BTV-16, BTV-17, BTV-18, BTV-21 e BTV-23), contudo, há evidências da circulação de 22 sorotipos (CHAND et al., 2015).

Na Austrália, a primeira identificação do VLA foi feita em 1978, entretanto o país foi considerado inicialmente como zona livre do VLA (MELVILLE et al., 2004). Em 2008, a Austrália notificou sete casos (7/1024) de LA em bovinos sem manifestação clínica, sendo o primeiro relato do BTV-2 no país. Os sorotipos BTV-1, BTV-3, BTV-7, BTV-9, BTV-15, BTV-16, BTV-20, BTV-21 e BTV-23 já haviam sido isolados em bovinos na região norte do país (OIE, 2016).

A primeira notificação do VLA na América do Norte ocorreu em 1952, na Califórnia, em decorrência a uma epidemia da doença causada pelo sorotipo BTV-10, isolado a partir de ovelhas infectadas. São considerados endêmicos no território norte americano os sorotipos: BTV-11, isolado em 1955 no Novo México; BTV-17, isolado em Wyoming no ano de 1962; BTV-13, isolado em Idaho-Flórida em 1967; e o BTV-1, isolado na Flórida no ano de 1983. Durante o período de 1999 a 2006, identificou-se o BTV-3 na Flórida e Mississippi. Os sorotipos BTV-5, BTV-6, BTV-14, BTV-19 e BTV-22 foram isolados na Flórida durante o período de 2002-2005, e em 2004, na Louisiana, foi identificado o BTV-1 (MERTENS; ATTOUI; MELLOR, 2008). Ainda segundo Mertens et al., (2005), os países localizados próximos aos subtrópicos como os Estados Unidos, possuem maior risco de terem seus rebanhos infectados por doenças enzoóticas (de forma endêmica).

Provavelmente, como consequência das mudanças climáticas, tem se observado a detecção de novos sorotipos (BTV-1, BTV-3, BTV-5, BTV-6, BTV-14, BTV-19, e BTV-22) do VLA em novas regiões nos Estados Unidos, sendo estes sorotipos de ocorrência detectada primeiramente na Europa (JOHNSON et al., 2006).

Na América Central e em regiões Caribenhas, foram isolados os sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-3, BTV-4, BTV-6, BTV-8, BTV-12, BTV14, e BTV-17, sendo que na América Central o sorotipo predominante é o BTV-1 (BARBER, 1979, GIBBS et al., 1983; HOMAN et al., 1985; MO et al., 1994).

Grande parte da América do Sul encontra-se inserida em uma área endêmica para a ocorrência do VLA, apresentando condições de temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento de vetores competentes, e inúmeras evidências sorológicas que indicam que o vírus está presente na região, contudo, a doença clínica raramente foi observada em bovinos (LOBATO; GUEDES; MATOS, 2015).

O primeiro relato de LA na América do Sul data de 1978, quando foi reportada à Organização Mundial de Saúde Animal a primeira evidência sorológica da ocorrência dessa doença no Brasil (SILVA, 1978; LAGER, 2004).

Na América do Sul, por meio de testes sorológicos detectou-se o VLA no Peru e no Chile (LOPEZ; NICOLETTI; GIBBS, 1985; TAMAYO et al., 1985; LAGER et al., 2004; MERINO MENA, 2011). No Equador, foi recentemente confirmada a infecção pelos sorotipos BTV-9, BTV-13, e BTV-18 em bovinos (VERDEZOTO et al., 2017). Na Bolívia, confirmou-se a infecção, mas não foi observada a doença clínica. O Paraguai é classificado como território com suspeita da doença, mas sem confirmação, enquanto que no Uruguai o vírus ainda não foi reportado (OIE, 2016). Na Colômbia, foi confirmada a presença dos sorotipos BTV-12, BTV-14, e BTV-17 (HOMAN et al., 1985). Na Guiana, os sorotipos BTV-14 e BTV-17 foram identificados, e no Suriname identificaram-se os sorotipos BTV-6, BTV-14 e BTV-17 (GUMM et al., 1984). Na América do Sul, os únicos países que possuem o VLA isolado e identificado por RT-qPCR e sequenciamento de porções do genoma são: Brasil (BTV-4, BTV-3, BTV-8; BTV-10; BTV-12, BTV-14, BTV-17, BTV-18, BTV-19 e BTV-22), Argentina (BTV-4) e mais recentemente Guiana Francesa (BTV-2, BTV-13 e BTV-17) (CLAVIJO et al., 2002; ANTONIASSI, 2010; LEGISA et al., 2013; LIMA, 2013; BALARO et al., 2014; VIAROUGE et al., 2014; MATOS et al., 2016; OIE, 2016).

O primeiro sorotipo do VLA isolado no Brasil foi a partir de amostras bovinas em 1980, onde oito de um total de 60 bovinos exportados do Brasil para os Estados Unidos apresentaram anticorpos contra o VLA (sorotipos BTV-4 e BTV-20) durante o período de quarentena quando em um dos animais foi isolado o BTV-4 (GROOCOOCK; CAMPBELL, 1982).

O segundo sorotipo do VLA isolado no Brasil foi o BTV-12 (CLAVIJO et al., 2002), em abril de 2001, a partir de amostras clínicas durante um surto de LA no Estado do Paraná, envolvendo 130 ovinos, quatro caprinos e 70 bovinos. Vinte e um carneiros e um bode apresentaram sinais clínicos compatíveis com LA. O sorotipo BTV-12 foi identificado por meio de teste de virusneutralização (VN) e posteriormente isolado (CLAVIJO et al., 2002).

Ainda no Estado do Paraná, no ano seguinte, ocorreram surtos consecutivos provocados pelo vírus, acometendo cabras e ovelhas, porém sem a identificação do sorotipo (LAGER et al., 2004; OIE, 2016).

Este mesmo sorotipo foi isolado em outros dois novos surtos também de ovinos, ocorridos em 2009, um em Viamão e o outro em Glorinha, ambos municípios do Estado do Rio Grande do Sul. Os animais apresentavam sinais clínicos sugestivos de LA, sendo posteriormente confirmado o diagnóstico para o BTV-12 por RT-PCR e sequenciamento (ANTONIASSI et al., 2010). O BTV-17 foi isolado e caracterizado por RT-PCR em um surto de LA ocorrido em 2014, em Cachoeira do Sul – RS, o surto da doença acometeu ovinos da raça Texel, havendo mortalidade de 28.89% (MATOS et al., 2016).

No Município de Vassouras-RJ, região do Vale do Paraíba Fluminense, durante o período de janeiro a abril de 2013, ovelhas leiteiras apresentaram sinais clínicos e patológicos sugestivos de LA, e por meio de isolamento e análise molecular foi identificado BTV-4 (LIMA 2013; BALARO et al., 2014).

Após o primeiro registro de LA (BTV-12) em 2009 (ANTONIASSI, 2010), o Estado do Rio Grande do Sul registrou mais sete surtos da doença, afetando ovinos no período de janeiro a outubro de 2014. Após colheita de amostras clínicas dos ovinos, identificou-se o sorotipo BTV-4 como sendo o causador dos sete surtos no Estado. Os animais envolvidos no surto apresentavam sinais clínicos como dispneia com corrimento nasal e laminite, e as lesões comumente encontradas foram pneumonia, hemorragia da artéria pulmonar e esofagite com úlceras (LOBATO et al., 2015).

No Estado do Paraná, durante o período de março de 2015 a junho de 2016, realizou-se um projeto de pesquisa na reserva ecológica de Itaipu, com propósito de estudar as doenças dos cervídeos encontrados na reserva. Alguns veados da espécie *Mazama nana* apresentaram sinais clínicos sugestivos de VLA, com posterior morte súbita. Realizou-se isolamento viral, RT-qPCR e sequenciamento nas amostras clínicas dos cervos, sendo identificados, pela primeira vez os sorotipos BTV-3, BTV-14, BV-17, BTV-18, BTV-19 e BTV-22 no território brasileiro (OIE, 2016).

Desde o primeiro relato do VLA no Brasil, outros levantamentos soroepidemiológicos, realizados em todas as regiões do país, com diferentes espécies de ruminantes domésticos e selvagens, têm evidenciado a presença do VLA em diversos Estados brasileiros, como Paraíba (MELO et al., 2000), Pará (MARTINS et al. 2011), Minas Gerais (CASTRO et al., 1992; LOBATO et al., 2001, KONRAD et al., 2003), São Paulo (NOGUEIRA et al., 2008,

VENDITTI, 2009, BERNARDES, 2011), Paraná, Santa Catarina (LAGER, 2004), Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2006), Mato Grosso do Sul (TOMICH et al., 2009), Tocantins (NEGRI FILHO et al., 2016) e Pernambuco (MAIA et al., 2016), entretanto, sem sinais clínicos da doença nos animais analisados.

3.11 Diagnóstico

O diagnóstico confirmatório da LA é realizado por meio de isolamento e identificação do vírus ou por métodos moleculares, e indiretamente, por meio de detecção de anticorpos específicos (OIE, 2016), uma vez que a resposta imune em ruminantes aparece de 7 a 14 dias após infecção e geralmente persiste por toda a vida do animal.

Por apresentar manifestações clínicas em pele e mucosas, a LA pode ser confundida com outras doenças de ruminantes de caráter infeccioso (febre aftosa, febre catarral maligna, estomatite papular bovina, doença hemorrágica epizootica, varíola bovina, rinotraqueíte infecciosa, diarreia viral bovina), ou não infeccioso (fotosensibilização, intoxicação), desta forma, o diagnóstico diferencial deve ser realizado analisando o contexto epidemiológico e as espécies envolvidas (WILLIAMSON; WOODGER; DARPEL, 2008; SAVINI et al., 2011; OIE, 2016).

As técnicas diagnósticas diretas e indiretas têm sido utilizadas na vigilância epidemiologia e emissão de certificados para comércio internacional de animais e de seus produtos (“Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” da OIE, 2016; Resolução MERCOSUL/GMC/RES nº. 16/05).

A pesquisa de anticorpos contra o VLA pode ser realizada pelas técnicas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto ou pelo ELISA competitivo (ELISA-C), Western-Blotting (WB), rádio imunoprecipitação (RIP) e pela virusneutralização (VN) (REDDINGTON; REDDINGTON; MACLACHLAN, 1991). Outros testes de diagnóstico baseados no reconhecimento antígeno-anticorpo, tais como imunofluorescência (IF), teste de fixação do complemento (FC), inibição de hemaglutinação (IH), podem ser utilizados para o diagnóstico do VLA (OIE, 2016).

Estes métodos de diagnóstico indireto utilizam como alvo as proteínas altamente conservadas do genoma do VLA, que são as proteínas VP3 e VP7, sendo determinantes na identificação das espécies do gênero *Orbivirus*.

A IDGA é uma técnica simples, que detecta anticorpos anti-VP7 (antígeno comum ao grupo). Portanto, esta prova não permite distinguir a resposta humoral produzida contra o VLA dos outros *Orbivirus* (vírus da Doença Equina Africana, vírus da Doença Hemorrágica Epizootica, Vírus da Encefalite Equina e o Vírus Palyam) (GORCHS; LAGER, 2001). Por esta razão, alguns centros de diagnóstico deixaram de fazer uso desta técnica (ATTOUI et al., 2005; 2009).

Reddington; Reddington; Maclachlan (1991) concluíram que a sensibilidade do ELISA-C é comparável à do WB, da RIP e da VN. Esses três métodos são altamente sensíveis e específicos para a detecção de anticorpos antipolipeptídeos virais específicos, mas, por serem muito trabalhosos, não são apropriados para o uso de diagnóstico de rotina. Recentemente, o ELISA-C, utilizando anticorpos monoclonais, foi padronizado e passou a ser o teste sorológico recomendado pela OIE.

A VN é recomendada pela OIE como técnica padrão na quantificação e identificação de anticorpos neutralizantes específicos contra o VLA (imunoglobulina G). A prova baseia-se nas interações que ocorrem *in vivo* entre os anticorpos produzidos pela resposta imune do animal e o vírus. Entretanto, o VLA possui alta variabilidade gênica, resultando muitas vezes em reações cruzadas entre os sorotipos, dificultando a interpretação final da prova. A VN tem como alvo anticorpos contra a proteína VP-2, responsável pelo reconhecimento dos receptores (epítomos) na membrana da célula hospedeira, e em função da sua variabilidade gênica é utilizada na determinação dos diferentes sorotipos por VN (MAAN et al., 2007).

As três principais técnicas de pesquisa direta do VLA são RT-qPCR, isolamento e sequenciamento. A pesquisa direta do VLA realizada por isolamento ou técnicas moleculares é obtida com base na viremia do animal infectado, a detecção de RNA viral, pode ser feita até 145 dias após a infecção, tempo muito semelhante à vida dos eritrócitos nos ruminantes, desta forma pode-se sugerir que esta interação do vírus com os eritrócitos possibilita os bovinos desempenharem o papel de reservatório natural do VLA (BREWER; MACLACHLAN, 1994). Com o emprego das técnicas moleculares, o VLA pode ser detectado em amostras de sêmen de animais em viremia e de sangue de ruminantes até 220 dias após a infecção (BHATTACHARYA; ROY; ROLE, 2010). Em outro estudo, Bonneau et al., (2002), demonstrou que o RNA viral pode ser detectado em sangue de ruminantes infectados por até 111-222 dias (BONNEAU, 2002).

Normalmente o diagnóstico de LA a partir de amostras clínicas é realizado por meio de exames laboratoriais visando a detecção do VLA por métodos moleculares ou isolamento

viral. As amostras de eleição a serem enviadas para a análise laboratorial são: sangue com anticoagulante, amostras de tecido, baço, linfonodo, medula óssea, língua, fígado, coração, cérebro, além de fetos abortados (AFSHAR, 1994; TWEEDLE; MELLOR, 2002; OIE, 2016).

A identificação do VLA, bem como a caracterização dos sorotipos, podem ser realizada de forma rápida e muito mais sensível, por meio da reação em cadeia pela polimerase “Polymerase Chain Reaction” (PCR) e/ou do sequenciamento do segmento 2 da ORF da VP-2 (LIMA, 2013), que é a proteína mais variável do genoma viral e contém a maior parte dos epítomos que interagem com os anticorpos neutralizantes, sendo, portanto, a maior determinante do sorotipo viral (MAAN et al., 2007).

A PCR é uma reação enzimática de polimerização de sequências de DNA *in vitro*. Devido ao VLA ter como molde inicial uma molécula de RNA, a primeira etapa da reação de PCR é a transcrição reversa (“reverse transcription” - RT), que transforma o RNA viral em um DNA complementar (cDNA) (VALASEK; REPA, 2005). Posteriormente, vem a etapa de desnaturação da dupla fita do DNA, por rompimento das pontes de hidrogênio. Em seguida ocorre a hibridização, caracterizada pela ligação da sequência-alvo a ser amplificada com pequenas moléculas com segmentos específicos do DNA e oligonucleotídeos, que são quimicamente sintetizados e de cadeia simples. A terceira etapa ocorre com a ajuda das enzimas polimerases, que fazem a extensão da nova fita de DNA, pela incorporação dos nucleotídeos, até que se formem outras muitas cópias idênticas às originais. Esse processo é repetido diversas vezes, até que haja ao final da reação milhares de cópias do cDNA original, uma vez que a replicação ocorre de maneira exponencial (POWLEDGE, 2004). A visualização do DNA amplificado pode ser feita pela eletroforese em gel de agarose e visualizado com a ajuda de um corante intercalante de ácido nucleico (KIDD et al., 2000).

Na PCR quantitativa (qPCR), ou PCR em tempo real, que consiste na mesma técnica da PCR convencional, contudo, é realizada a amplificação e quantificação do número de cópias de DNA amplificados em cada ciclo, simultaneamente (LIMA, 2013). Os dados de amplificação são coletados ao longo da PCR, ao invés de serem apenas no final da reação, após um número fixo de ciclos. A visualização na qPCR está associada a compostos, chamados de sondas, que emitem fluorescência no decorrer da reação, tendo correlação direta com o número de cópias do gene-alvo amplificado. A rapidez com que o sinal de fluorescência atinge um nível de limiar de detecção está diretamente ligada com a quantidade do alvo presente na amostra, sendo, portanto, um teste quantitativo. Assim, durante a amplificação, um programa de computador específico constrói, em tempo real, um gráfico

relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA das amostras (VALASEK; REPA, 2005). A qPCR, que possui mais de uma funcionalidade, tem como uma das opções de resultado a quantificação absoluta do vírus, sendo que a carga viral é medida por meio do número de cópias de RNA existentes na amostra. A qPCR tem sido muito utilizada nos últimos anos por ser um teste rápido e de alta sensibilidade, pois possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nos quais os microrganismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou mesmo em amostras altamente diluídas (BHUDEVI; WEINSTOCK, 2003).

Para detecção do VLA em amostras clínicas, culturas de células infectadas ou mesmo no vetor, sem que haja a tipificação ou caracterização molecular do sorotipo envolvido (exame dito como triagem), é realizado por meio de técnicas moleculares (RT“nested”-PCR, RT-PCR ou RT-qPCR), geralmente utilizam-se oligonucleotídeos e sondas específicos para anelamento nas regiões altamente conservadas da ORF NS-1 ou NS-3 (WILSON, 2009; OIE, 2016). Estes métodos de triagem para o VLA são os métodos oficiais, recomendado pela OIE, para diagnóstico do VLA em animais que serão transportados e/ou comercializados entre diferentes países (OIE, 2016).

A detecção de regiões únicas do segmento sorotipo-específico do VLA tem o potencial para identificar os sorotipos de forma rápida e confiável. A principal vantagem do uso dos métodos moleculares em relação aos métodos sorológicos, ou ao isolamento viral, é a redução do tempo para obtenção de resultados. Além disso, as técnicas moleculares apresentam maior sensibilidade e especificidade, representando um método laboratorial rápido e preciso (OIE, 2016).

Diversos trabalhos têm sido publicados nos últimos anos envolvendo a utilização de RT-PCR e RT-qPCR, tanto para a detecção quanto para a tipificação do VLA (JOHNSON et al., 2000; JIMENEZ-CLAVERO et al., 2006; WILSON, 2009; VANBINST et al., 2010; LEBLANC et al., 2010; MACLACHLAN et al., 2010; MERTENS et al., 2013; OIE, 2016; MAAN et al., 2016), com o propósito de auxiliar na detecção do VLA, sendo este, considerado um vírus com grande variabilidade gênica. Recentemente, Maan e colaboradores (2016) descreveram o processo de desenvolvimento e padronização de oligonucleotídeos e sondas tendo como alvo o segmento genômico 2 (Seg-2), específicos para a identificação de 28 diferentes sorotipos do VLA.

O primeiro relato de isolamento do VLA usando a técnica de inoculação em OEG foi feito por Manson et al., em 1941. Goldsmit; Barazilai (1968) usaram a via intravenosa para a

inoculação do vírus em OEG e relataram uma sensibilidade aproximadamente 1000 vezes maior quando comparada com a via de inoculação através do saco vitelínico.

Em 1992, Babu, isolou o VLA de ovinos soropositivos a partir de hemácias lavadas, inoculadas pela via intravenosa em OEG incubados a 33,5 °C. A cada passagem, os embriões que morreram ou que demonstraram lesões (hemorragia e edema) foram processados e inoculados em células BHK-21 “Baby Hamster Kidney Cell” e VERO “*African Greenmonkey Kidney*”.

Segundo Clavijo et al. (2000), o VLA pode ser isolado a partir de amostras de tecidos, sêmen, “pool” de insetos vetores ou preferencialmente de eritrócitos colhidos no período de viremia, por meio da inoculação intravenosa em ovos embrionados de galinha (OEG). O armazenamento de amostras de sangue que não sofreram o processo de lavagem de hemácias deve ser evitado, pois reduzirá a possibilidade de sucesso no isolamento, pela presença de anticorpos na amostra de sangue, que podem neutralizar o vírus (CLAVIJO et al., 2002). Após o vírus ter sido amplificado no OEG, é passado para cultura de células de linhagem BHK-21 para subsequente replicação e identificação, por métodos moleculares.

O isolamento do VLA, para ser bem sucedido, depende primeiramente da presença de concentrações adequadas de vírus e infraestrutura laboratorial para cultivo de células e biotério, bem como técnicos capacitados (CLAVIJO et al., 2002).

A escolha da linhagem celular para o isolamento do VLA deve ser avaliada com cuidado, pois seu sucesso dependerá de como a cultura celular suporta a multiplicação do vírus. As linhagens de células do tipo BHK-21 e VERO são altamente susceptíveis, com os sinais de efeito citopático aparecendo em torno de 2-5 dias após a inoculação (WECHSLER; HOLLAND, 1988), contudo, é necessário inocular inicialmente em OEG. Além das linhagens celulares BHK-21 e VERO, o vírus também pode ser isolado em outros tipos de linhagens celulares, tanto de mamíferos, CPAE (“Calf Pulmonary Artery Endothelial Cell”), quanto de insetos (CK – derivada de *Culicoides sonorensis*, e C6/36 derivada do *Aedes albopictus*) (WECHSLER; MCHOLLAND; TABACHNICK, 1989; MECHAM, 2006).

A caracterização de sorotipos virais também tem sido feita por meio de sequenciamento. Neste método, são utilizados sequenciadores de DNA, que são equipamentos que leem uma amostra de DNA e geram um arquivo eletrônico com símbolos que representam a sequência de bases nitrogenadas – A, C, G, T – contidas na amostra. Em 1986, foi lançado o primeiro sequenciador automático de DNA, o ABI 370, e em 1998, o primeiro sequenciador de eletroforese capilar, o ABI 3700. Com a automatização, foi possível realizar

grandes projetos de sequenciamento, dentre os quais o genoma humano, do camundongo e outros (VARUZZA, 2013).

O sistema 454 foi a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada. A plataforma 454 realiza o sequenciamento baseado em síntese, o pirosequenciamento (RONAGHI et al., 1998). Segundo Horodesky (2014), atualmente, os sequenciadores estão divididos em 1ª geração (Degradação química e Interrupção da cadeia-Sanger), 2ª geração (454-Roche®, Illumina® Genome Analyser-HiSeq/MiSeq™ e SOLiD), 3ª geração (Ion Torrent® e PacBio RS®) e 4ª geração (Nanopore®).

As novas tecnologias de sequenciamento, também chamadas de sequenciamento de nova geração “Next Generation Sequencing”, ou simplesmente NGS, são tecnologias de sequenciamento de DNA que utilizam metodologias diferentes da Sanger, com o objetivo de acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento.

Horodesky (2014) ressalta que, em análises metagenômicas, é viável a utilização os sequenciadores de nova geração, pois permitem a construção de grandes bibliotecas. Um dos principais sequenciadores indicado para este tipo de análise é o Illumina®.

As plataformas de NGS são uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional, possuem o princípio de obter maior eficiência que advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis. A clonagem *in vitro* em suporte sólido permite que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez com a plataforma 454, Solexa ou SOLiD Pirosequenciamento e a tecnologia 454 (CARVALHO; SILVA, 2010).

No preparo da amostra, o DNA é fragmentado por um processo químico, mecânico ou enzimático. Os fragmentos gerados nesse processo de quebra são chamados de “template”, esta quebra é feita de forma aleatória, com o propósito da fragmentação uniforme por todo o genoma. Após a fragmentação, são adicionados ao “template” adaptadores e sequências artificiais conhecidas. Uma vez ligados os adaptadores, as amostras são misturadas, amplificadas e sequenciadas juntas. Após o processo de sequenciamento, essa parte do adaptador é lida e as amostras são separadas computacionalmente.

Os sequenciadores Illumina® plataforma Solexa™, baseiam-se no conceito de “sequenciamento por síntese”. As sequências a serem determinadas precisam ser convertidas numa biblioteca de sequenciamento especial, permitindo a amplificação e imobilização das

sequências. Para este propósito, dois adaptadores diferentes são adicionados às terminações 5' e 3' de todas as moléculas.

Para gerar a biblioteca, o DNA deverá ser desnaturado e as fitas simples serão dispostas em concentrações muito baixas, pelos canais de uma célula de fluxo, também denominado “flow cell”. A “flow cell” é uma superfície de clonagem, dividida em oito linhas, permitindo o sequenciamento de até oito bibliotecas. Na superfície da “flow cell” estão imobilizados dois tipos de oligonucleotídeos, dos quais são complementares aos dois adaptadores utilizados para produzir a biblioteca. Estes oligonucleotídeos hibridizam com as moléculas das cadeias das bibliotecas. Por síntese reversa, começando pela zona hibridizada, a nova molécula que está sendo criada encontra-se covalentemente ligada à “flow cell”.

Esta nova molécula dobra-se e liga-se a outro oligonucleotídeo complementar ao segundo adaptador que não está ligado à placa, podendo ser usado para sintetizar uma segunda cadeia ligada também covalentemente à placa. Este processo de dobra da molécula e de síntese reversa, chamada de amplificação em ponte é repetida várias vezes e cria aglomerados de milhares de cópias da sequência original, muito próximos na célula de fluxo (Figura 7). Estes aglomerados distribuídos aleatoriamente contêm cópias idênticas da mesma sequência. Deste modo as bibliotecas estão prontas para serem sequenciadas (HORODESKY, 2014).

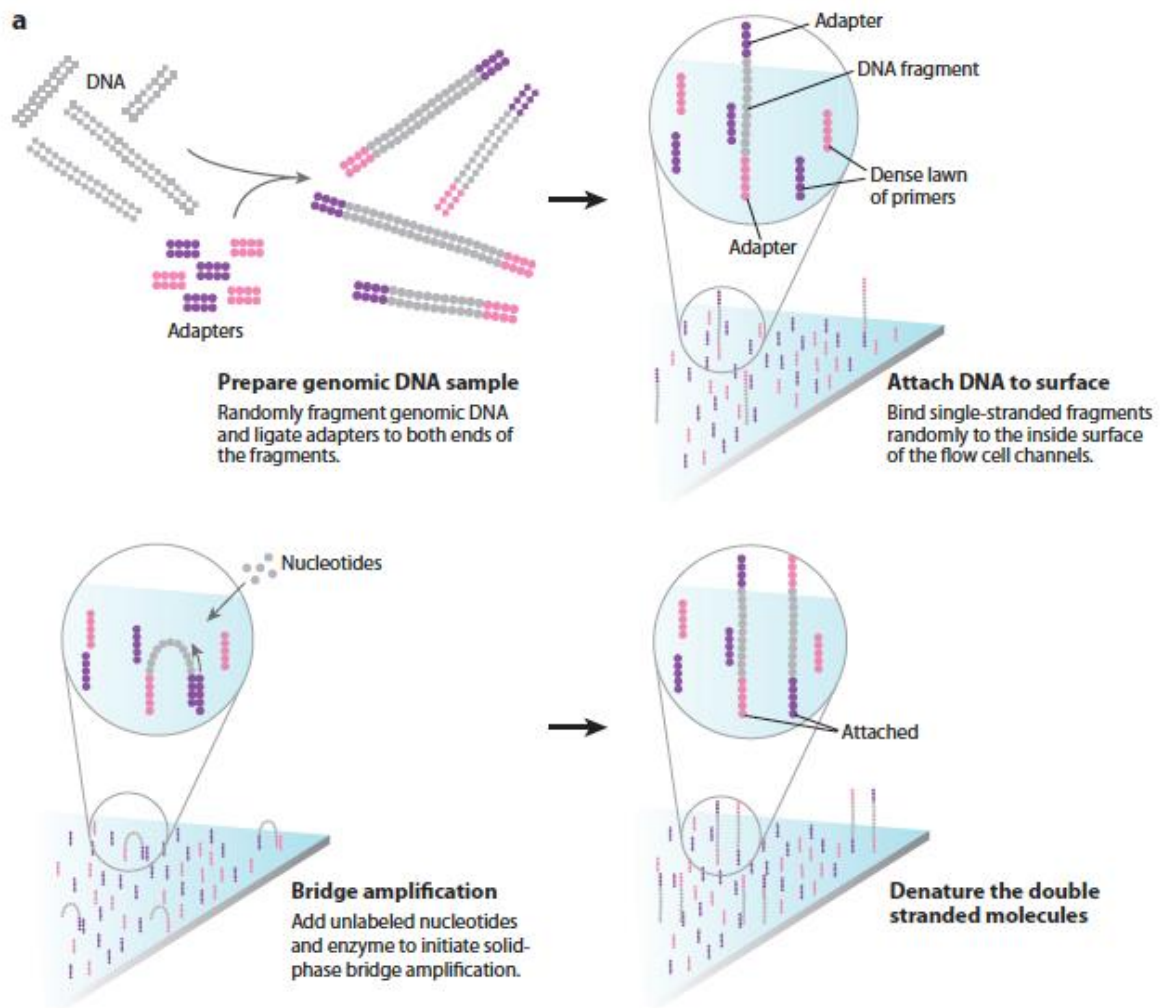


Figura 7 -Funcionamento do processo de sequenciamento do Illumina®.
Fonte: Horodesky (2014).

Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada. Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior, para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-50 bases são obtidas de cada cluster (SHENDURE; JI, 2008; HORODESKY, 2014).

O “RNASeq”, também chamado “the Whole Transcriptome Shotgun Sequencing” (WTSS) é usado no NGS para sequenciar cDNA com a intenção de capturar as informações do transcriptoma de um organismo. Ao contrário de outras técnicas, como “Microarray” ou RT-PCR, o RNASeq não necessita de uma lista pre-definida dos gene que se deseja detectar. A princípio, qualquer transcrito que estiver sendo expresso pode ser detectado se o

experimento tiver cobertura suficiente. Além disso, o RNASeq permite detectar, além da expressão, eventos de “splicing” alternativo e expressão de genes desconhecidos.

Quando não se tem um genoma de referência, é necessário realizar a montagem o “denovo”. O processo de montagem “denovo” é muito mais trabalhoso do que o mapeamento com referência. pois, é necessário ter uma cobertura muito maior e os programas de montagem cometem muito mais erros do que os programas de mapeamento. Apesar disso, é possível obter bons resultados na montagem de genomas bacterianos com relativo pouco esforço. Para genomas de organismos superiores, é necessário combinar diversas tecnologias de sequenciamento e utilizar computadores com quantidades massivas de memória RAM para efetuar o processo de montagem do genoma.

Após um experimento de NGS, é quase sempre necessário fazer o mapeamento das leituras geradas em um genoma de referência. O primeiro programa usado com a finalidade de realizar este mapeamento foi o BLAT (LI; KRISTIANSEN; WANG, 2008), criado por Jim Kent para mapear leituras com alta similaridade contra um genoma de referência. O BLAT não consegue alinhar regiões com menos de 40 bp e também não tem desempenho suficiente para alinhar os milhões de “reads” gerados por um NGS. Os primeiros mapeadores “open source” otimizados para NGS foram o MAQ (LI; RUAN; DURBIN, 2008) e o SOAP (LI; KRISTIANSEN; WANG, 2008) ambos utilizam “hash tables” para acelerar a busca, com a diferença que o MAQ indexa os “reads”, enquanto o SOAP indexa o genoma de referência.

Outros programas utilizados para realizar o mapeamento são: Mapreads do SOLiD, FM-Index, que indexa o genoma de referência compactado pela Burrows-Wheeler (WHEELER; BURROWS, 1994; FERRAGINA; MANZINI, 2001) e entre os programas que implementam esta técnica estão o BWA (LI; DURBIN, 2009; 2010), “Bowtie” (LANGMEAD et al., 2009) e o SOAPv2 (LI, et al., 2009).

O “bowtie” (LANGMEAD; TRAPNELL, 2009) é um mapeador bastante popular, criado para mapear “short reads”, especialmente eficiente para “reads” com 50 bp ou menos. A versão mais nova, “bowtie 2” (LANGMEAD; STEVENS, 2012) suporta alinhamentos com “gaps”, e por isso é mais adequado para “reads” com 100 bp ou mais. Em termos de algoritmo, o “bowtie” 2 é muito similar ao TMAP. Diversos softwares utilizam o bowtie como mapeador, em especial o pipeline de análise de RNA-Seq Tophat (TRAPNELL; PACTHTER; SALZBERG, 2009) e o pipeline na nuvem de ressequenciamento Crossbow (LANGMEAD; TRAPNELL, 2009).

3.12 Perdas econômicas em decorrência do VLA

As estimativas de perdas econômicas em decorrência da infecção pelo VLA variam de acordo com a espécie de ruminante e raça acometida, e também conforme o estado imunitário do rebanho, a virulência das estirpes virais e sorotipos envolvidos, bem como a região do país e época do ano.

As principais consequências econômicas em decorrência à infecção pelo VLA, tanto para ovinos quanto para bovinos e caprinos, são as perdas indiretas relacionadas à restrição internacional de movimentação animal e seus germoplasmas (ARADAIB et al., 2005).

Os prejuízos decorrentes de animais infectados incluem considerada queda da produção de lã, carne, e leite, diminuição da taxa de concepção além de abortos e malformações, distúrbios respiratórios e locomotores, associação de outras doenças devido à imunossupressão, em ovinos podendo ocorrer morte em 50% dos casos de animais com infecção aguda e convalescença prolongada (SINGER; MACLACHLAN; CARPENTER, 2001; BREARD et al., 2004; ARADAIB et al., 2005; MACLACHALAN et al., 2009).

Para estimar o impacto econômico da LA no Brasil, seria necessário correlacionar todas as informações referentes aos surtos da doença, contudo, faltam informações importantes relacionadas à ocorrência da doença, tornando difícil avaliar com precisão as perdas econômicas (LOBATO et al., 2015). Balara et al. (2013) avaliaram os custos do surto de LA de 2013 no Estado do Rio de Janeiro. O estudo de caso com prospecção longitudinal, conduzido nas fazendas afetadas de março de 2013 a agosto de 2013, avaliou todos os custos de tratamento relacionados à LA e comorbidades subsequentes nos rebanhos. Com a mortalidade, o aborto, as medicações usadas, os serviços veterinários e de mão-de-obra adicional, bem como a queda da produção registrada em seis meses, levaram a uma perda de US \$ 6.700 (LOBATO et al., 2015).

3.13 Principais medidas de controle e prevenção da LA

Não existe tratamento específico para os animais com LA, normalmente é realizado o tratamento indireto ou sintomático visando minimizar os sintomas característicos da doença, utilizando de alguns medicamentos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroidais (RADOSTITS et al., 1994; TWEEDLE; MELLOR, 2002).

O controle da doença está baseado em quarentena, vacinação dos hospedeiros vertebrados, especialmente dos bovinos, controle do vetor, monitoramento e medidas de restrição de comércio (OIE, 2016).

A melhor forma de controlar a LA seria o controle do vetor, porque baixando os níveis populacionais do mosquito, seriam reduzidos também significativamente os níveis eficazes para a sua transmissão. Para o controle do vetor, são necessárias modificações ambientais que visem à eliminação dos sítios de reprodução dos mosquitos, bem como a eliminação de locais com acúmulo de água (SCHMAHL, 2009). É possível proteger os animais em estábulos, com a colocação de telas e portas e janelas feitas de uma malha fina ou um tecido grosseiro impregnado com inseticida (RADOSTITS, 1994; CALVETE et al., 2010). Com o mesmo objetivo, também podem ser utilizados inseticidas de uso externo em ambientes como estábulos, porém essas práticas têm efeito temporário, além de poderem causar problemas ambientais e serem de alto custo. Para a utilização dessas medidas, é necessário o conhecimento da fauna entomológica competente de cada região, hábitos alimentares, o ciclo biológico da população e da dinâmica do vetor na região e aplicação em época certa e com boas condições climáticas (LOBATO, 1999; BREARD et al., 2004).

A vacinação visa diminuir as perdas econômicas e reduzir o número de animais susceptíveis e, por conseguinte, o número de animais virêmicos, sendo ideal que se conheçam os sorotipos existentes na região e que esses sejam incluídos na vacina (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008). A vacinação já é uma medida bastante eficaz e muito utilizada em alguns países como medida de controle, sendo elas: atenuadas, inativadas, ou produzidas em poxvírus e com proteínas recombinantes, denominadas “VLPs” (“vírus like particles”), essas últimas são partículas virais vazias, sem ácido nucléico (BREARD et al., 2004; SAVINI et al., 2008). Estas vacinas já estão disponíveis comercialmente; entretanto, sua atividade protetora é sorotipo-específica, ou seja, a vacina deve ser produzida com base nas informações epidemiológicas dos sorotipos prevalentes da determinada regiões ou países, onde houver múltiplos sorotipos estão presentes, para serem eficazes, as vacinas, precisam conter todos os sorotipos identificados (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008; BHANUPRAKASH et al., 2009).

Atualmente, a vacina inativada é a mais utilizada, porque o vírus inativado elimina os riscos de transmissão vetorial, a reversão da virulência, e o aparecimento de anomalias fetais (OIE, 2016). Em bovinos, quando administrada em uma única dose, geralmente é insuficiente para proporcionar uma imunidade duradoura por vários meses (SAVINI et al., 2008). As

desvantagens incluem seu elevado custo de produção (a vacinação requer grandes quantidades de antígeno, adjuvante e inativante) e a necessidade de um reforço vacinal (VERWOERD; ERASMUS, 2004).

Vacinas atenuadas são baratas de produzir em grandes quantidades, geram imunidade protetora após uma única inoculação, e têm se apresentado eficazes na prevenção da doença clínica da LA (DUNGU; GERDES; SMIT, 2004). No entanto, possuem alguns inconvenientes, por representarem risco de teratogenia se administradas em ovelhas em início de gestação. Também tem sido considerada a possibilidade da ocorrência de recombinação gênica entre linhagens do vírus vacinal e de campo, resultando em novos tipos virais que podem induzir variações nas características conhecidas de virulência, ou expressar novas propriedades antigênicas (BREARD et al., 2004). Na África do Sul, China e diversos países da Europa, a vacina atenuada tem sido utilizada por anos e são conhecidas por induzir uma efetiva e duradoura imunidade (STOTT; OSBURN, ALEXANDER, 1985; MURRAY; EATON, 1996; ODEON; SCHORE; OSBURN, 1997; BHANUPRAKASH et al., 2009).

O uso de vacinas deve ser feito somente após testes de segurança, a fim de avaliar as possibilidades de reversão viral, transmissão vertical e suas possíveis consequências adversas, antes de serem administradas de acordo com a espécie e o sorotipo (SAVINI et al., 2014).

O passo fundamental para impedir a entrada do vírus em um país livre da LA é identificar quais sorotipos existem no país exportador e se existem *Culicoides* competentes para esses sorotipos no país importador. Entretanto, a infecção pela LA apresenta um caráter “silencioso”, ou seja, na grande maioria os animais não manifestam sinais clínicos aparentes. Em regiões onde a LA é endêmica, a possibilidade de erradicação é praticamente nula, por este motivo, as medidas de controle baseiam-se na ação sobre o vetor, na vacinação e nas barreiras criadas para evitar a movimentação de animais e seus subprodutos (KONRAD et al., 2003).

Diversos países possuem eficientes programas de vigilância e controle do VLA, dada à importância da doença. Um exemplo é a Austrália, que começou a implementar medidas sanitárias de controle da LA desde 1970, e atualmente existe um órgão governamental chamado “Beatrice Hill Farm” (BHF), responsável pelos intensos trabalhos de vigilância e monitoramento do VLA no país. O programa de monitoramento australiano divide o país em zonas epidemiológicas conforme a presença do vírus, associado à presença dos principais fatores de risco da LA. Assim como em alguns países da Europa (Itália, França, Espanha), que possuem um programa de controle e monitoramento da LA, na Austrália, bovinos são

utilizados como sentinelas em zonas consideradas livres de *Orbivirus*, o país realiza pesquisas entomológicas com captura e identificação e monitoramento das espécies de *Culicoides* competentes, estudos com modelos de dispersão da doença, além investir no diagnóstico da LA (isolamento, sorologia e diagnóstico molecular) (MELVILLE et al., 2015).

A Índia também possui programa de vigilância para o VLA, constituído por diversos grupos de pesquisa que formam a “All-India Network Program on Bluetongue (AINP-BT)”. Com base nas informações obtidas, através das pesquisas realizadas, são conhecidos os sorotipos circulantes no país, onde atualmente é comercializada uma vacina inativada pentavalente para os sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-10, BTV-16 e BTV-23, apresentando excelentes resultados (REDDY et al., 2010).

Quanto constatado o caso de LA, preconiza-se como medida prioritária a proibição imediata da importação de animais provenientes de países com VLA, acompanhado do constante monitoramento da propriedade, com realização de exames clínicos, sorológicos e moleculares, para assegurar que os animais são livres de VLA (SPERLOVA, ZENDULKOVA, 2011). De acordo com a OIE, para importação de animais susceptíveis e seus produtos (sêmen, óvulos, embriões, etc.), as medidas preventivas para entrada do VLA são o controle de importação animal e quarentena, acompanhada de realização de testes moleculares para detecção do VLA (OIE, 2016).

Na América do Sul, o controle da LA se dá pela contenção de focos (notificação obrigatória da doença), controle de fronteiras e, especialmente na Argentina e Brasil, também por vigilância e monitoramento de animais (EMBRAPA, 2006).

No Brasil ainda não existe um programa nacional de vigilância e monitoramento do VLA, e também é proibida pelo MAPA a comercialização de vacinas contra a doença, devido à falta de conhecimento sobre quais sorotipos possuímos, em quais regiões estão presentes, quais são as espécies de vetores competentes. Tais informações, entretanto, são de extrema necessidade para que haja avanços no controle e monitoramento da LA, pois representa uma ameaça à sanidade de rebanhos, à preservação de espécies nativas e à comercialização, interferindo diretamente na economia.

Torna-se fundamental cada país avaliar os fatores de risco, para o controle da LA, com o objetivo de contribuir para este propósito, fornecendo subsídios para o maior conhecimento sobre o VLA no Brasil, o presente estudo teve como principal finalidade o isolamento, identificar e caracterização dos sorotipos circulantes em diferentes espécies no país.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Na realização desta pesquisa, seguiu-se todas as diretrizes éticas preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL / COBEA), sendo o projeto aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto Biológico – CETEA-IB. (Anexo 1).

4.2 Amostragem

4.2.1 Origem das Amostras

A presente pesquisa foi realizada a partir de amostras selecionadas com e sem suspeita clínica para LA, bem como a partir de amostras já isoladas do VLA (LIMA, 2013), pertencentes à coleção de amostras mantida no Laboratório de Viroses de Bovídeos.

Foram analisadas diferentes tipos de amostras, sendo 33 de sangue bovino e duas de órgãos fetais bovino, 51 de sangue ovino e três amostras de órgãos ovino, três amostras de sangue caprino, 36 amostras de sangue de cervídeos e órgãos de outros quatro cervídeos, todos pertencentes às espécies *Blastocerus dichotomus*, *Mazama americana* e *Mazama gouazoubira*. Foram analisadas também, 124 amostras positivas para VLA, isoladas em ovo embrionado de galinha e adaptadas a cultura celular BHK-21 (Tabela 3). Totalizando 256 amostras de diferentes espécies, ovinos, bovinos, caprinos, e cervídeos, encaminhadas ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, provenientes de diferentes regiões do país, por veterinários oficiais e autônomos.

As amostras eram de animais de ambos os sexos, diferentes raças, com idade entre três a 36 meses, provenientes de diversas propriedades localizadas em quatro diferentes regiões do Brasil, Região Norte (Estado do Pará), Região Nordeste (Estado da Paraíba), Região Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), e Região Sul (Paraná). As amostras de ovinos analisadas, provenientes do Estado de São Paulo, faziam parte de um projeto FAPESP de pesquisa – regular sobre língua azul (Processo Nº: 2008/04879-9), durante o período de 2007 – 2009, e que todas as amostras foram coletadas de ovinos sem nenhum sinal clínico da doença. Na

Tabela-3, estão apresentados os dados referentes à amostragem, conforme a espécie animal, o tipo de amostra analisada, a quantidade da amostra, a faixa etária, e o Município/Estado de origem de cada animal. Todas as amostras foram recebidas e processadas no Laboratório de Virose de Bovídeos (LVB) do Instituto Biológico (IB), no período de janeiro de 2007 a abril de 2015.

Tabela 3 -Dados das amostras analisadas, conforme idade, origem e espécie.

Espécie	Tipo de amostra	Quantidade	Faixa etária	Cidade / Estado
Região Norte				
Cervídeo	Órgãos	04	Animal adulto**	Santarém / Pará
Região Nordeste				
Caprina	Isolado*	01	03 - 36 meses	Não informado / Paraíba
Região Sudeste				
Bovina	Sangue	34	12-36 meses	Sertãozinho / São Paulo
Bovina	Órgãos	01	Feto abortado	Martinópolis / São Paulo
Bovina	Órgãos	01	Feto abortado	Não informado / São Paulo
Ovina	Sangue	10	03 e 36 meses	Sorocaba / São Paulo
Ovina	Isolados*	16	03 - 36 meses	Sorocaba / São Paulo
Ovina	Sangue	13	03 - 36 meses	Nova Odessa / São Paulo
Ovina	Isolados*	36	03 - 36 meses	Nova Odessa / São Paulo
Ovina	Sangue	8	03 - 36 meses	Itapetininga / São Paulo
Ovina	Isolados*	5	03 - 36 meses	Itapetininga / São Paulo
Ovina	Sangue	3	03 - 36 meses	Botucatu / São Paulo
Ovina	Sangue	14	03 - 36 meses	Araçatuba / São Paulo
Ovina	Isolados*	48	03 - 36 meses	Araçatuba / São Paulo
Ovina	Órgãos	01	Feto abortado	Vinhedo / São Paulo
Caprina	Sangue	03	05 - 36 meses	Itú /São Paulo
Cervídeo	Sangue	18	05 - 36 meses	Jaboticabal / São Paulo
Cervídeo	Sangue	01	05 - 36 meses	Castilho / São Paulo
Ovina	Órgãos	02	03 - 18 meses	Rio de Janeiro
Ovina	Isolados*	13	03 e 36 meses	Rio de Janeiro***
Bovina	Sangue	01	36 meses	Rio de Janeiro***
Ovina	Sangue	06	03 e 36 meses	Rio de Janeiro***
Região Sul				
Cervídeo	Sangue	17	Animal adulto**	Foz do Iguaçu /Paraná
Total de amostras analisadas:				256

*Suspensão celular, ou macerado de órgãos de OEG. **Animal de vida livre, sem dados referentes à idade.

*** Municípios da região do Vale do Paraíba Fluminense.

4.2.2 Preparo das amostras de sangue

O procedimento de lavagem da hemácias foi realizado de acordo com as recomendações preconizadas no Manual Padrão para Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE (2016). O sangue foi centrifugado a 12000 rpm, durante 30 minutos a 4 °C. O plasma foi retirado e as células sanguíneas lavadas e ressuspensas em igual volume de PBS (Tampão Salina Fosfatada) estéril. O sobrenadante resultante desta etapa foi descartado, essa etapa se repetiu por mais uma vez e, por fim, foram retirados aproximadamente 400 µL de hemácias e distribuídas em microtubos de 1,5 mL previamente identificados.

As alíquotas foram acondicionadas a temperatura de -80 °C até a realização dos testes.

4.2.3 Preparo das amostras de tecido

As amostras de tecidos (epitélio, coração, sistema nervoso central, fígado, baço, pulmão, rins, rúmen, língua, linfonodos e fetos, provenientes de fêmeas com suspeita clínica de LA), foram preparadas com dois gramas de tecido em 8 mL de meio MEM (meio essencial mínimo de Eagle – Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), com 2% de antibióticos (mistura de antibióticos preparada: Penicilina G Potássica 11.200 UI/mL; Estreptomicina 0,01 g/mL; Gentamicina 0,01 g/mL; L-Glutamina 0,029 g/mL e Anfotericina B 0,5 mg/mL), trituradas e mantidas sob refrigeração por uma hora.

Após este período, as amostras foram congeladas a -80°C, posteriormente centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante recolhido para a análise laboratorial. As amostras que resultaram positivas na prova de triagem para VLA (RT-qPCR – detecção do gene NS3) foram acondicionadas a temperatura de -80°C até o uso para os estudos subsequentes (isolamento em OEG, tipificação e sequenciamento filogenético).

4.2.4 Envio das amostras para o *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise* "G. Caporale" (IZSAM), Teramo, Itália.

Todas as amostras foram preparadas e enviadas para o departamento de virologia do IZSAM da seguinte forma:

Amostras de lavado de hemácias, sangue total e suspensão celular: todas as amostras com conteúdo líquido foram fracionadas em alíquotas de 500 µL e acondicionadas em tubos de 3 mL, contendo 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™);

Amostras de órgãos: as amostras de órgãos foram fracionadas em fragmentos de tecidos cortados a uma espessura de aproximadamente 0,5 cm de largura por 0,5cm de altura, e acondicionadas em tubos de 3 mL, contendo 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™).

4.3 Estirpe viral padrão

Utilizou-se como vírus padrão na etapa de isolamento viral a estirpe viral 4 do VLA (BTV-4), gentilmente cedida pelo LANAGRO de Campinas.

4.3.1 Amostras controle utilizadas no isolamento viral

Foi utilizado como controle positivo no isolamento em OEG 0,1 mL da suspensão do BTV-4 com o título viral de 10^3 TCID₅₀/mL. Como controle negativo para o isolamento em OEG foi inoculado 0,1 mL de meio MEM, sendo estas amostras negativas posteriormente testadas no Laboratório de Virose de Bovídeos (LVB) pela RT-PCR em tempo real e isolamento em cultura de linhagem BHK-21.

4.4. Culturas celulares

Foram utilizadas células da linhagem celular de rim de Hamster- “Baby Hamster Kidney” (BHK-21) adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, EUA).

As células foram cultivadas em garrafas de poliestireno próprias para cultivo celular (TPP, Techno Plastic Products AG®, Switzerland) em meio de crescimento, composto por Meio Essencial Mínimo (MEM – Nutricell®, Campinas, Brasil), acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio (Merck®, Darmstadt, Alemanha), tamponado com 25 mM de ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazineetanossulfônico (HEPES – Biosolve®, Westford, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino esterilizado, inativado e livre de pestivírus (SFB – Nutricell®, Campinas, Brasil). Foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C.

Para a manutenção das linhagens, o repique das células foi feito entre três e cinco dias, utilizando-se solução de Tripsina-Versene (Sigma- Aldrich®, Steinheim, Alemanha) para a individualização das células (concentração cerca 2×10^5 /mL). Para obtenção das suspensões de células utilizadas nas reações de VN, o repique foi realizado da mesma forma, diferindo apenas a concentração, que foi 3×10^5 /mL. A contagem das células para preparação da diluição necessária foi efetuada em câmara de Neubauer (Optik Labor®, Friedrichshofen, Alemanha).

4.5. Isolamento do vírus da língua azul

Todos os procedimentos realizados no isolamento do VLA seguiram os parâmetros determinados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), presentes no “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” (OIE, 2014),

4.5.1. Isolamento em Ovo Embrionado de Galinha (OEG)

Todos os OEG utilizados nesta pesquisa foram gentilmente doados pela Biovet®, que segue todos os requerimentos técnicos específicos para a produção, o controle e o uso de vacinas e diluentes para uso na avicultura brasileira, tendo como base legislativa a Instrução Normativa N° 7, de 10 de Março de 2005, e a Portaria N° 138, de 05 de junho de 2006 do MAPA. Os OEG eram todos ovos SPF (do inglês “Specific Pathogen Free”-Livres de Patógenos Específicos), mantidos em ambiente com sistema de ar filtrado, pressão positiva e biossegurança.

As amostras positivas foram inoculadas em OEG viáveis de 11 dias, de acordo com Clavijo et al. (2000), com algumas modificações. Para cada amostra positiva do VLA, preconizou-se inocular quatro OEG, por passagem.

Antes da inoculação, todos os OEG foram examinados com o auxílio de um ovoscópio para avaliar a vitalidade e viabilidade dos mesmos. As inoculações foram feitas sempre nos vasos de maior calibre, longe de bifurcações venosas e respeitando o fluxo sanguíneo (Figura 8). Em cada ovo foi inoculado 0,1 mL da diluição 1:10 de cada amostra (Figura 9).

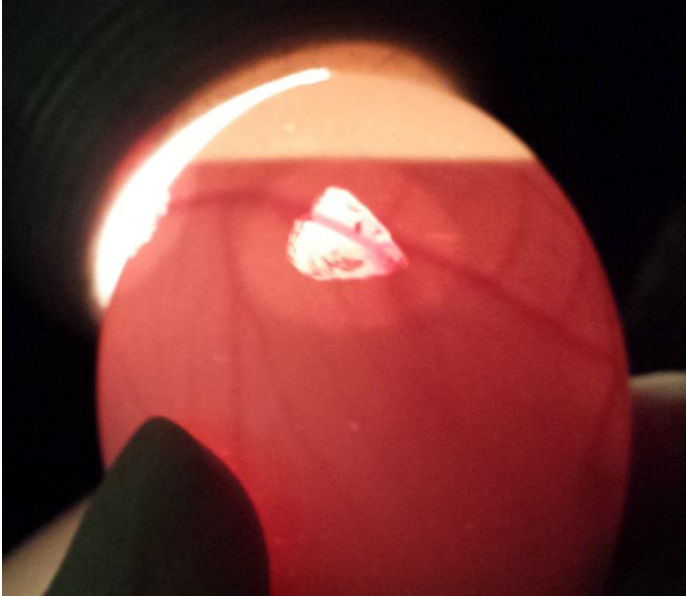


Figura 8 - Visualização dos ramos venosos para inoculação, com auxílio de um ovoscópio.
Fonte: Lima, 2017.



Figura 9 - Inoculação de amostra positiva em OEG.
Fonte: Lima, 2017.

Após a inoculação, os ovos foram incubados por sete dias a uma temperatura de 33,5°C e observados no mínimo três vezes ao dia em diferentes períodos, para detecção de sinais clínicos, lesões ou mortalidade.

Os ovos embrionados mortos antes de completar as primeiras 24 horas foram descartados, os demais embriões que morreram entre o 2º e 7º dia após a inoculação foram refrigerados a 4 °C por no máximo 24h até serem processados conforme Clavijo et al. (2000). Todos os embriões que tiveram alterações macroscópicas foram fotografados, e as alterações descritas.

Para remoção dos embriões, as cascas dos ovos foram desinfetadas com uma solução de álcool 70%. Com o auxílio de tesoura, pinça e placa de Petri estéreis, todo o embrião foi retirado de dentro do ovo, evitando contaminação com o saco da gema. Foram coletadas, identificadas e armazenadas em tubos de três mL de plásticos estéreis, as vísceras (fígado, baço, coração, pulmão e rins) (Figura 10), e separadamente o SNC (Figura 11). A coleta separada teve como intuito minimizar possíveis contaminações. Estes tubos foram guardados em freezer a -80°C até a realização do macerado para isolamento em cultura celular BHK-21 e da extração para diagnóstico molecular.



Figura 10 -Foto da necropsia de um embrião de galinha inoculado com amostra positiva para o VLA – coleta das vísceras para posterior análise.

Fonte: Lima, 2017.



Figura 11 -Foto da necropsia de um embrião de galinha inoculado com amostra positiva para o VLA – SNC coletado separadamente das vísceras para posterior análise.

Fonte: Lima, 2017.

Os tecidos foram macerados em solução de meio MEM suplementado com 1% de Antibiótico (ATB) e 1% de L – Glutamina. Este macerado foi congelado a -20°C , para promover melhor lise celular, depois descongelado e centrifugado em tubos estéreis a $2000 \times g$ por 15 minutos à 4°C . Após o processamento, essa suspensão foi inoculada em cultivo celular de células BHK-21.

4.5.2. Isolamento em Cultura Celular BHK-21 – Formação do Banco Viral

A suspensão resultante do isolamento em OEG foi inoculada em cultivo celular de linhagem BHK-21, com 70-90% de confluência no momento da inoculação, esta passagem em células destina-se a manutenção das amostras e inclusão na coleção viral.

O procedimento para inoculação em células foi remoção do meio e a suspensão de tecidos inoculada e adsorvida por uma hora e posterior incubação por um período de três a seis dias, a uma temperatura de 37°C , em um ambiente com 5% de CO_2 . As garrafas inoculadas foram observadas diariamente para a presença de efeito citopático (ECP) e as células controle permaneceram livres de ECP. As amostras inoculadas que não tiveram aparecimento de ECP na primeira passagem, foram re-inoculadas em cultivo celular sucessivamente até a terceira passagem. As amostras que não tiveram ECP nas três passagens foram consideradas negativas, ou seja, não ocorreu adaptação do vírus ao sistema celular *in vitro*.

4.6 Amostras controle utilizados nos testes moleculares

Utilizou-se como controle positivo na RT-qPCR a diluição 10^{-3} (10^2 TCID₅₀/50 μ L) do VLA sorotipo 4 e como controle negativo amostras de sangue ovino e bovino, além de tecidos embrionados de galinha e amostras negativas de cultura celular BHK-21, previamente testado pela RT- qPCR e isolamento viral no LVB.

4.7 Extração do RNA

A extração do RNA viral das alíquotas das amostras de sangue, tecidos, cultura celular BHK-21 e da solução estoque do VLA-4 foram feitas empregando-se o TRIzol® Reagent (Invitrogen™) em microtubos de 1,5 mL de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações.

Para cada 250 μ L da amostra foram acrescidos 750 μ L de tampão de lise (TRIzol® Reagent - Invitrogen™), e após serem misturados com o auxílio do vórtex, ficaram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se então 200 μ L de clorofórmio e agitou-se em vórtex por 30 segundos. Foram novamente incubados por cinco minutos de 15 a 30 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos entre 2-8°C e ao término da centrifugação, transferiu-se aproximadamente 400 μ L do sobrenadante para um novo tubo. Precipitou-se com 500 μ L de isopropanol, procedeu-se a homogeneização por inversão e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi novamente centrifugada a 12.000 xg por 10 minutos a 2-8°C e após desprezou-se o sobrenadante. Ao fim lavou-se o “pellet” com um mL de etanol 75% e homogeneizou-se por inversão. Centrifugou-se agora a 10.000 xg por cinco minutos. Retirou-se o etanol com auxílio da pipeta e procedeu-se mais uma lavagem com 1 mL de etanol absoluto e homogeneizou por inversão. Centrifugou-se novamente a 10.000 g por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o tubo foi deixado aberto à temperatura ambiente por cinco minutos até secagem do etanol. Por fim, dissolveu-se o pellet em 30 μ L de água DEPC com auxílio da pipeta e o RNA extraído ficou estocado a -80°C.

4.8 RT-qPCR realizada no Brasil

4.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos e sonda utilizados foram desenvolvidos por Schroeder et al. (2013), para serem utilizados no método de RT-qPCR, a partir da região altamente conservada da proteína não estrutural do gene NS3 do VLA. As sequências dos oligonucleotídeos e sonda foram analisadas pelo BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), obtendo 100% de identidade com as sequências dos 27 sorotipos do vírus da VLA depositadas no Genbank.

Para a realização da RT-qPCR utilizou-se o equipamento “Light Cycler” 480 (Roche), disponível no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo.

Na RT-qPCR foi utilizado o sistema TaqMan, com filtro de detecção FAM, feita com os kits comerciais da Applied Biosystems™ - VetMAX™ Bluetongue Virus (BTV), Reagents, VetMAX™ Plus Multiplex One Step RT-PCR Kit, e o kit VetMAX™ Bluetongue Virus (BTV) Controls, onde estão inclusos respectivamente os “primers” e as sondas, a enzima, e o controle interno positivo. O kit é padronizado para detecção dos 26 sorotipos do VLA pela empresa fabricante. O controle positivo interno, utilizado foi de 8.000 cópias de RNA/μL. Em todas as reações foi utilizada uma nova curva padrão, feita com diluições do RNA sintético.

4.8.2. Condições de reação

A técnica foi realizada de acordo com as instruções do kit comercial “LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes” (Roche). A reação foi feita para um total de 20 μL contendo 7,4 μL “LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes” 2,7X, 1,3 μL de “Activator” 50 mM, 1,0 μL de “Enhancer” 20X, 1,0 μL de cada oligonucleotídeo a 10 mM, 0,5 μL da TaqMan “probe” para BTV a 10mM, 5,8 μL de H₂O PCR-grade. Por fim acrescentou-se 2 μL de RNA.

4.9. RT-qPCR realizada na Itália

As 256 amostras encaminhadas para o IZSAM, foram retestadas por RT-qPCR para avaliar a integridade e a concentração do RNA após o transponte das amostras BTV positivas do Brasil para a Itália.

4.9.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos e sonda utilizados para a detecção do VLA, foram desenvolvidos segundo Chaignat et al. (2009), e Hofmann et al. (2008), para serem utilizados no método de RT-qPCR, a partir da região conservada da proteína não estrutural do gene NS3 do VLA.

Para controle de inibição da reação de RT-qPCR na detecção do VLA, foram usados como controle interno positivo RNA recombinante do vírus “West Nile”, com oligonucleotídeos e sonda que amplificam a região NS5-2 do genoma do vírus, segundo Hubálek; Halouzka, (1999).

Para a realização da RT-qPCR, utilizou-se os equipamentos “QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System” (Applied Biosystems), o 7900HT “Fast Real-Time CR System” (Applied Biosystems), e o “Thermal cycler, GeneAmp PCR System 9700” (Applied Biosystems), disponíveis no “Reparto di Virologia” e “Biologia Molecolare” do IZSAM.

Para avaliar a eficiência da reação, foram utilizados como controles:

- NTC (“No Template Control”) é um controle negativo da reação. É constituído por todos os reagentes do Mix da reação de RT-qPCR, com exceção do RNA, que é substituído por 5 µL de água “Nuclease Free”;
- CP (“Positive Control”) foi utilizado como controle positivo na RT-qPCR duas diluições do VLA-10, 10^{-1} e 10^2 , com os respectivos Ct’s (“Threshold cycle”) previamente conhecidos;

Para avaliar a eficiência da amplificação, foi utilizado o “software SDS Sequence Detection System” (Applied Biosystem) para a validação dos Ct’s das curvas-padrão.

A reação foi feita para um total de 7 µL por amostra, contendo 0,5 µL de oligonucleotídeo BTVNS3-F e 0,5 de oligonucleotídeo BTVNS3-R, ambos diluídos na concentração de 20 µM e 4,0 µL de H₂O PCR-grade, por fim acrescentou-se 2 µL do RNA extraído da amostra.

As condições utilizadas para realizar a desnaturação do RNA foram:

- 95 °C por cinco minutos;
- Banho de gelo por três minutos.

Na realização da RT-qPCR, foi utilizado o kit da enzima SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen). A reação foi feita para um total de 25 µL.

4.10 Sequenciamento

O sequenciamento e parte da análise filogenética foi realizada no departamento de “Ricerca e sviluppo” (Pesquisa e desenvolvimento) e Bioinformática do “Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise G. Caporale” (IZSAM), - Teramo”, considerado laboratório de referência internacional pela OIE no diagnóstico de língua azul.

4.10.1 Análises prévias ao sequenciamento

Quantificação do material genético

Depois das amostras serem analisadas pela RT-qPCR para detecção do RNA do VLA, apenas as amostras que obtiveram Ct (“Threshold Cyclers”) inferior ou igual a 35 foram quantificadas e preparadas com a finalidade do sequenciamento. Por experiência do laboratório do IZSAM, sabe-se que amostras com Ct maior que 35 possuem pouco material genético, ou com baixa qualidade, o que comprometeria a qualidade das sequências. Desta forma, as amostras analisadas que obtiveram Ct inferior ou igual a 35 foram quantificadas para avaliar a quantidade do RNA do RNA viral.

A detecção e quantificação do RNA e DNA das amostras extraídas, bem como a avaliação dos mesmos foram feitas através da absorvância-UV, com o equipamento Qubit® Fluorescence quantitation (ThermoFisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante.

Degradação do DNA

Para algumas amostras cuja concentração de DNA era alta, foi utilizado conforme as orientações do fabricante, a enzima DNase TURBO™ (ThermoFisher Scientific), na

concentração de 2 U/mL. A DNase foi utilizada para limpar a contaminação de DNA a partir de amostras de RNA antes da RT-PCR.

Purificação do RNA total

Após o processo de degradação do DNA, as amostras foram purificadas e o RNA estabilizado com o “kit” de purificação de RNA total, RNeasy® Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações e uso do fabricante.

Após a etapa de purificação, todas as amostras foram quantificadas novamente com o equipamento Qubit® Fluorescence quantitation. Esta etapa foi realizada novamente para assegurar que não tenham restado contaminantes ou inibidores nas amostras.

Amplificação dos ácidos nucléicos

As amostras de RNA foram preparadas conforme o “Protocollo SISPA BTV” do “Riparto di Ricerca e Sviluppo”. Esta terminologia SISPA, vem do inglês “sequence-independent, single-primer amplification”, que significa sequência independente, onde a amplificação do material genético utiliza “somente o oligonucleotídeo”. Com este protocolo, é possível obter sequenciamento completo do genoma viral de forma mais rápida e flexível, devido ao uso de “primers random”, desenhados a partir de vários tipos de matrizes virais. O uso deste protocolo permite a obtenção de sequências genômicas quase completa de vírus, que variam em tamanho de 3.000 a 15.000 kb, com uma profundidade de cobertura média de 14,33. Este protocolo é utilizado quando há pouca ou nenhuma informação de sequência disponível, quando o vírus pertence a famílias muito divergentes, quando não há anteriormente caracterização viral, ou para descrever mais completamente infecções virais mistas. Conforme Figura 12, no método SISPA, (A) o RNA viral é convertido em cDNA, com auxílio dos oligonucleotídeos com marcação aleatória (FR26RV-N e FR40RV-T), pela poli-A. (B) O DNA da segunda cadeia é sintetizado pela ação da polimerase de exo-DNA de Klenow, na presença de iniciadores de oligonucleotídeos finais 5', marcados aleatoriamente nos fragmentos virais. (C) O DNA de cadeia dupla é amplificado por PCR usando a marca primária (FR20RV). (D) Os “amplicons” produzidos são separados por eletroforese e produtos que variam entre 500 e 1000 nucleótidos são clonados no vetor TOPO. De 96 a 288 colheitas são feitas, o DNA plasmidial é purificado e as inserções são sequenciadas.

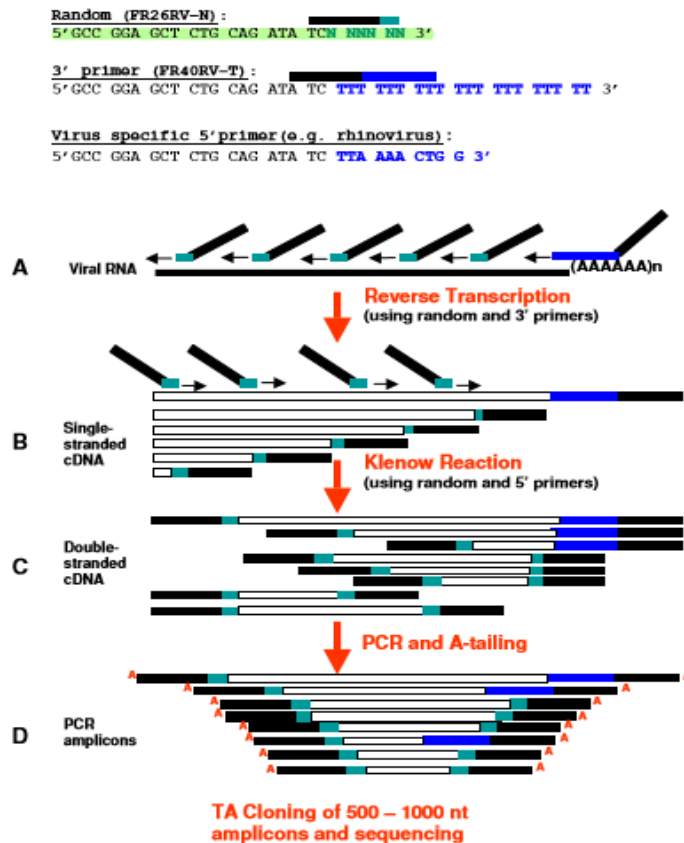


Figura 12 - Esquema ilustrativo do método SISPA, utilizando no sequenciamento genômico do VLA.
Fonte: Djikeng et al. (2008)

Os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações do RNA viral foram desenvolvidos segundo Djikeng et al. (2008) e Allander et al. (2005), as sequências usadas bem como o tamanho do fragmento estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação e tamanho do fragmento resultante.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado
FR26RV-	N 5'GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNNN-3'	
FR-BT_F	5'-GCCGGAGCTCTGCAGATATCGTTAAAN-3'	600 - 1,500 bp
FR-BT_R	5'-GCCGGAGCTCTGCAGATATCGTAAGTN-3'	

Antes de serem amplificadas, todas as amostras passaram por um processo de desnaturação de 95°C por cinco minutos, em seguida foram colocadas em gelo por três minutos, até a etapa da amplificação. Na primeira amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos: FR26RV-N na concentração de 50 µM, o “primer” FR-BT_F e o “primer” FR-BT_R, ambos diluídos na concentração de uso de 2 µM. Acrescentou-se dNTPs a 10 mM

e 9 μL de RNA. Após o preparo, o “mix” foi homogeneizado, centrifugado e incubado a 65°C por cinco minutos.

Posteriormente, realizou-se o preparo de um segundo “mix” com: SSIV “Buffer” 5X concentrado, DTT a 100 mM, RNase OUT “Recombinant RNase Inhibitor”, SuperScript IV Reverse Transcriptase 200 U/ μL . Após o preparo, o “mix” foi homogeneizado, centrifugado e adicionou-se 7,0 μL do produto da primeira amplificação. As condições de amplificação foram: 23°C, por 10 minutos, 50°C por 50 minutos, e 80°C por 10 minutos. Ao término da reação foi adicionada a enzima 3’-5’ Klenow Polymerase, na concentração de 2.5 M às amostras e novamente incubadas a 37°C por 60 minutos e 75°C por 10 minutos.

Para a realização da terceira reação de PCR, foi utilizado o “kit” da enzima “PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase”, conforme as indicações do fabricante.

Purificação

Após todas as etapas de amplificação do material genético, através das reações de PCR, as amostras amplificadas foram purificadas usando o kit comercial “Purificare con Ampure XP o colonnine® (Qiagen, GeneAll), conforme recomendações do fabricante.

Ao término da purificação do material genético amplificado, todas as amostras foram quantificadas para obtenção do valor do DNA total amplificado. Esta quantificação foi feita através da absorvância-UV, com o equipamento Qubit® Fluorescence quantitation (ThermoFisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante.

Verificação da concentração do VLA amplificado

Realizou-se uma última reação de PCRq para confirmar que o DNA amplificado correspondia ao VLA. Para a otimização da reação, foi utilizada a enzima TaqMan® Fast 2X (ThermoFisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante.

Foram utilizados nesta etapa os mesmos oligonucleotídeos e sonda, específicos para a região NS3 do VLA, (HOFMANN et al., 2008; CHAIGNAT et al., 2009).

4.10.2 Sequenciamento

Para a realização do sequenciamento, o DNA de cada amostra foi preparado em uma concentração de 5 ng/ μL , para preparação da biblioteca. Desta amostra foi realizado a diluição de uso contendo a concentração de 1 ng/ μL .

Para a realização desta etapa, foi utilizando o kit Nextera® XT DNA Library Prep (Illumina®, San Diego, Califórnia U.S.A), de acordo com o protocolo do fabricante. Todos os sequenciamentos genômicos foram realizados no equipamento Illumina®, Plataforma NextSeq™ 500 (Illumina® Inc., San Diego, Califórnia) utilizando reagentes NextSeq™ 500/550, cartucho v2, 300 ciclos e “standard” de 150 pb.

4.11. Análise de dados – Bioinformática

Ao término de cada sequenciamento, as milhares de “reads” geradas passaram por um controle de qualidade, realizado por um “software” chamado FastQC, disponível em <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>. Atráves deste “software”, foi feita a leitura e a “limpeza” dos fragmentos de modo “in-house”, utilizando “scripts python”.

Dentro do programa deste “software” foram depositadas todas as sequências de referências para todos os 27 sorotipos do VLA, separados por sorogrupos a partir do NCBI (Nucleotides Database).

Para realizar a montagem, foi utilizado o programa SPADES versão 3.5.0 (NURK et al., 2013). Todas as análises realizadas pelo SPADES foram executadas com parâmetros predefinidos. Todos os “contigs” que surgiram na análise foram filtrados por um “script python” implementando de modo “in house” a remover todos os “contigs” mais curtos do que 400 nucleotídeos, bem como remover todos os “contigs” que não possuíam sequência de leitura.

Para atribuir a cada “contigs” o fragmento codificado das proteínas previamente baixados, foi usado o “software” Blastx (CAMACHO et al., 2008). Nesta etapa, todos os “contigs” foram comparados com os “contigs” retidos.

Todos os fragmentos “perdidos” foram montados por mapeamento da seguinte forma: várias sequências para cada um dos fragmentos ausentes foram transferidos para cada sorotipo, comparando as leituras e mapeando todos os fragmentos de forma independente para cada um deles. Para a realização desse processo foi usado o “software” Bowtie2 (LANGMEAD; STEVEN, 2012).

Para obtenção das sequências consenso, foi usado o programa Samtools (LI et al., 2009). As sequências obtidas foram classificadas com base na leitura de cobertura e na percentagem de sequências montadas. A melhor sequência com base a este consenso de pontuação permaneceu e a outra foi descartada.

A leitura dos dados foi realizada usando o mapeamento da sequência obtida, contra a sequência retida.

Por fim, foi realizada ainda uma “inspeção” visual para excluir a presença de artefatos no alinhamento.

4.12 Análises das Sequências

As sequências de nucleotídeos obtidas, referentes aos 10 segmentos genômicos do VLA foram submetidas ao “BLAST”, e alinhadas usando os programas “CLUSTAL” e “BioEdit Sequence Alignment Editor”. Posteriormente, as sequências foram traduzidas com auxílio do programa SeqPup v. 0.6f , para “Macintosh”. O grau de identidade entre as sequências de nucleotídeos referentes ao segmento 2, região ORF da proteína VP-2 (capsídeo externo – determinante da estirpe viral), foram deduzidos usando o programa PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002).

4.13 Análises Filogenéticas

A análise filogenética das sequências genômicas foi realizada de duas formas: por meio de um “software” desenvolvido e validado pelo departamento de bioinformática do laboratório “Ricerca e Sviluppo” do IZSAM, onde foram analisados todos os 10 segmentos do VLA. Outra forma de análise foi construindo a árvore filogenética com sequências do segmento 2 analisadas pelo programa PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002), com o objetivo de realizar análise de modelo matemático de substituição de nucleotídeos.

As sequências obtidas do segmento 2 do VLA das amostras sequenciadas, bem como das sequências de referências para os 28 sorotipos do VLA, obtidas no “GenBank”, foram submetidas à análise, utilizando o programa PAUP v.4.0b10, com busca heurística. Os valores de “bootstrap” foram obtidos usando o método “branch-and-bound”, que se baseia na ideia de desenvolver uma enumeração inteligente das soluções candidatas à solução ótima inteira de um problema.

Após definição do modelo matemático evolutivo (estimativa de substituição de nucleotídeos e distribuição gama), realizado no programa Modeltest v 3.06 (POSADA; CRANDALL, 1998), conclui-se que o modelo ideal para análise das sequências obtidas foi Tamura Nei, sendo algumas árvores filogenéticas produzidas com o uso do programa PAUP.

Outras foram confeccionadas utilizando o programa MEGA (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis”), versão 7.0, sob critérios Máxima Verossimilhança (TAMURA et al., 2013).

4. 14 Análise Climática das regiões

Com o propósito de investigar a distribuição espacial dos casos de LA nos municípios onde os sorotipos foram caracterizados, e associar aos padrões climáticos nos períodos de ocorrência do VLA, realizou-se a análise dos fatores ambientais nas regiões.

Coletou-se e analisou-se os dados climáticos referentes à precipitação e temperatura média das estações meteorológicas localizadas nos municípios de origem, onde foram coletadas as amostras. Os municípios analisados, bem como suas respectivas coordenadas de geolocalização, e o período em que foram coletados os dados estão descritos na Tabela 5.

Os dados foram obtidos a partir da base de dados meteorológicos históricos do IMET (Instituto de Meteorologia) disponível em (<http://www.inmet.gov.br>), e do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO). Todos os cálculos de média e somatório foram realizados no Excel (versão 2010), também utilizado na elaboração dos climogramas.

Para a classificação dos municípios estudados utilizou-se o sistema de classificação climática de Köeppen-Geiger (ALCARDE et al., 2013), em que segundo Alvares et al, (2013), os padrões climáticos são determinados pela sazonalidade e os valores médios anuais e mensais de temperatura do ar e precipitação, além de considerar aspectos geográficos, ecológicos, vegetação e distribuição dos biomas que predominam em cada região.

Tabela 5 - Classificação climática dos municípios referente à amostragem estudada, conforme local de coleta (Estado e Município) e geolocalização (latitude e longitude).

Estado	Município	Latitude	Longitude	Classificação Climática
São Paulo	Araçatuba	21° 12'	50° 25'	^a Aw
São Paulo	Castilho	20° 50'	51° 29'	^a Aw
São Paulo	Itapetininga	23° 35'	48° 03'	Cfa
São Paulo	Itu	23° 15'	47° 17'	Cfa
São Paulo	Jaboticabal	21° 15'	4° 19'	Cwa
São Paulo	Martinópolis	20° 08'	51° 10'	Cfa
São Paulo	Nova Odessa	22° 46'	47° 17'	Cfa
São Paulo	Sertãozinho	21° 08'	47° 59'	Cwa
São Paulo	Sorocaba	23° 30'	47° 27'	Cfa
São Paulo	São Paulo	23° 32'	46° 38'	Cwa
Rio de Janeiro	Vale do Paraíba Fluminense (VPF)	22° 24'	43° 39'	Cwb
Paraná	Foz do Iguaçu	25° 32'	54° 35'	Cfa
Paraíba	-	07° 29'	36° 17'	As
Pará	Santarém	02° 26'	54° 42'	As

As-clima tropical húmido, chuvas no inverno; ^a**Aw**-tropical chuvoso com inverno seco; **Cfa**- subtropical húmido com verão quente sem estação seca no inverno; **Cwa**- clima subtropical/tropical de altitude com chuvas no verão e seca no inverno; **Cwb**-clima temperado marítimo/clima tropical de altitude; **BSh**- clima das estepes quentes de baixa latitude e altitude;

Com base na amostragem estudada, e nas coordenadas geográficas das propriedades em que foram detectados os casos positivos para o VLA, foi realizada a localização espacial do vírus no Brasil, durante o período de agosto de 2007 a abril de 2015 (Figura 13).

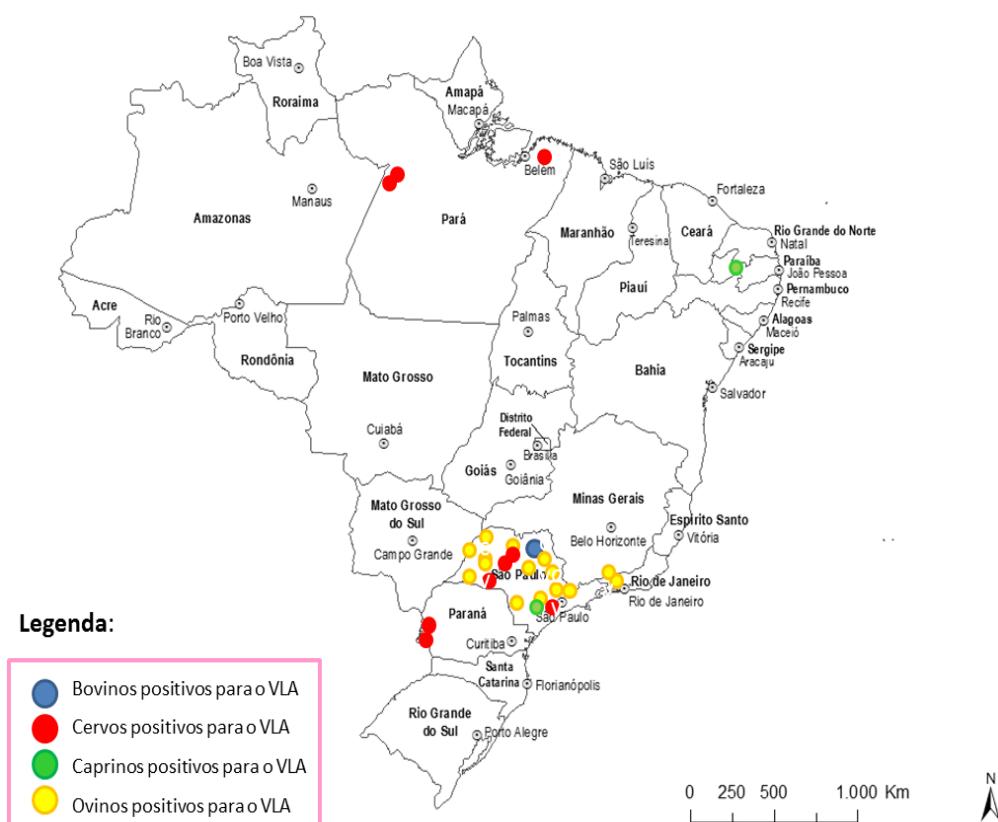


Figura 13 -Distribuição espacial dos animais positivos para VLA, conforme a espécie animal e a localização das propriedades nos Estados brasileiros.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento em ovo de galinha embrionado (OEG)

Das 256 VLA positivas foram inoculadas 207 e isoladas 150, os dados estão apresentados na tabela 03. Na figura 14 estão indicadas as porcentagens do total de amostras (sangue e tecidos de ovinos, bovinos, cervídeos e caprinos) positivas do VLA isoladas frente ao número total inoculado que foi de 72,46% (150/207). Todos os embriões que morreram nas primeiras 24 horas após a inoculação foram descartados.

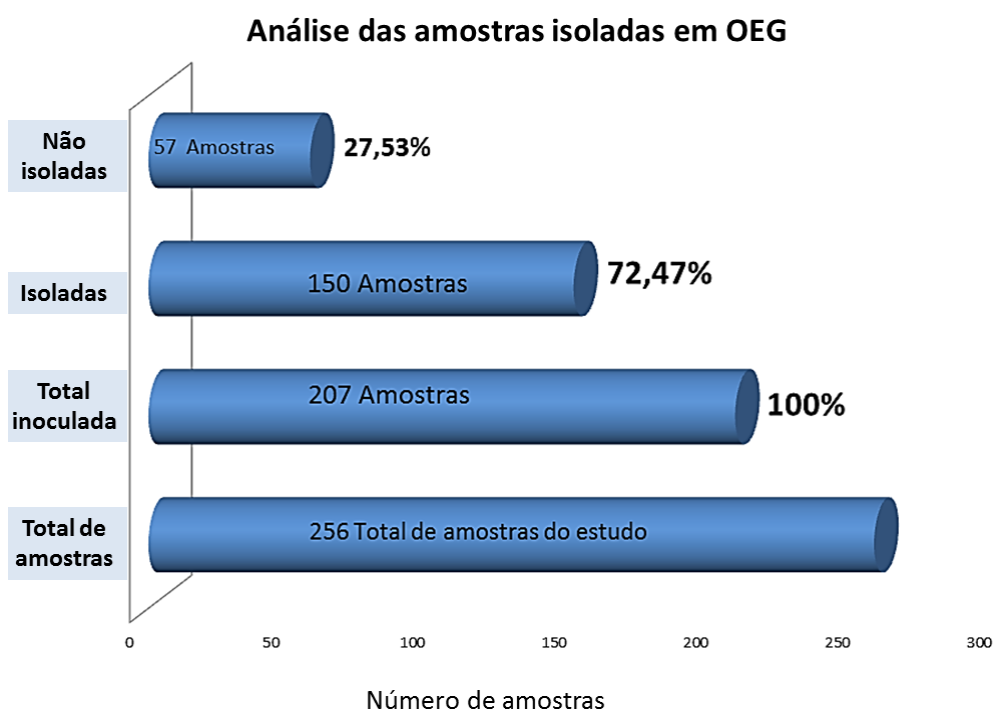


Figura 14 - Total de amostras isoladas em OEG.

Das 150 amostras isoladas em OEG em primeira e segunda passagem, 85% (127/150), foram capazes de provocar alterações macroscópicas visíveis nos embriões de galinha.

Foram inoculados o total de 683 embriões de galinha, entre as amostras de campo e os controles utilizados para o isolamento, sendo que deste total, 634 OEG foram inoculados apenas com a amostragem estudada. Destes 489 embriões apresentaram alguma lesão pós-inoculação e vieram a óbito 77,12% (489/634) apresentaram lesões características da infecção provocada pelo VLA, como edema e hemorragia cerebral, hemorragia bem como petéquias

hemorrágicas no tegumento, e em alguns casos em vísceras (principalmente fígado e coração), conforme é possível visualizar nas Figuras 10, 15, 16 e 17.

As lesões mais observadas nos embriões foram: hemorragia em pontos ou disseminada (Figuras 16, 17), retardo no desenvolvimento embrionário (Figura 17), teratogenia, agenesia de membros e anasarca, ausência ou incompleto fechamento da cavidade abdominal com exposição das vísceras (Figuras 16).

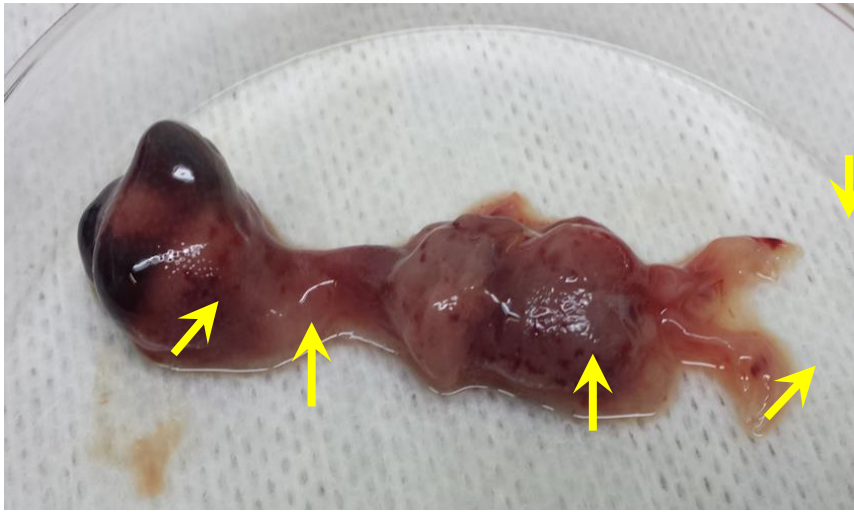


Figura 15 – Embrião de galinha morto ao 4º dia após a inoculação de amostra com suspeita clínica para LA, o mesmo apresenta diversos pontos hemorrágicos em cabeça e tronco, além de inúmeras petéquias hemorrágicas em pescoço, abdômen e membros inferiores (setas).
Fonte: Arquivo pessoal, Instituto Biológico, 2015.

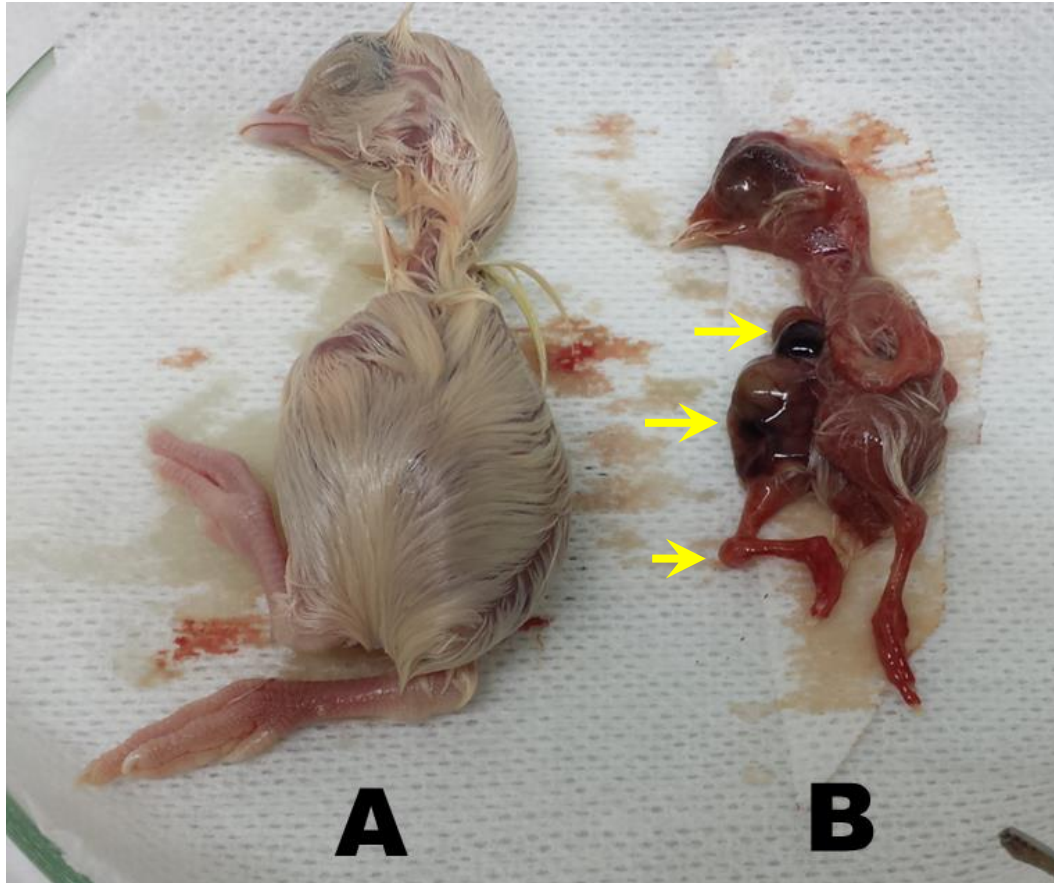


Figura 16 – Embriões de galinha mortos no 6º dia após a inoculação. Da esquerda para a direita, o primeiro embrião (A) foi inoculado com meio MEM (controle negativo), apresentando características normais de desenvolvimento. O segundo embrião (B), inoculado com amostra positiva para o VLA, apresenta aspecto hemorrágico generalizado, visível retardo no desenvolvimento embrionário, teratogenia de membro inferior direito e falha no fechamento das cavidades abdominal e torácica, com exposição das vísceras (setas).

Fonte: Arquivo pessoal, Instituto Biológico, 2015.



Figura 17 - Embrião de galinha inoculado com amostra positiva do VLA, morto ao 4º dia após a inoculação. Diversos focos hemorrágicos em SNC, associado à necrose liquefativa (malácia) (setas). Não fechamento das cavidades abdominal e torácica, associada a exposição visceral (setas).

Fonte: Arquivo pessoal, Instituto Biológico, 2015.

Nas análises realizadas, foram também calculados os resultados referentes ao tempo de morte embrionária após a inoculação, e dispostos na Tabela 6. Os resultados demonstraram que mais da metade dos embriões de galinha inoculados 58,4% (399/683) morreram nos quatro primeiros dias após serem inoculados.

Tabela 6 - Mortalidade embrionária calculada em dias pós inoculação, com o número de embriões mortos, e a porcentagem.

Tempo de morte embrionária pós inóculo em dias	Nº de embriões mortos	%
2º dia	39	5,7%
3º dia	278	40,7%
4º dia	82	12,0 %
5º dia	127	18,6%
6º dia	112	16,4%
7º dia	45	6,6%
Total	683	100,0%

O terceiro dia após a inoculação foi o período em que se constatou maior morte embrionária, 40,7% do total de embriões inoculados, seguido do quinto e segundo dia, após inoculação, com 18,6% e 16,4% respectivamente, conforme Tabela 6 e Figura 18.

Mortalidade embrionária calculada em dias

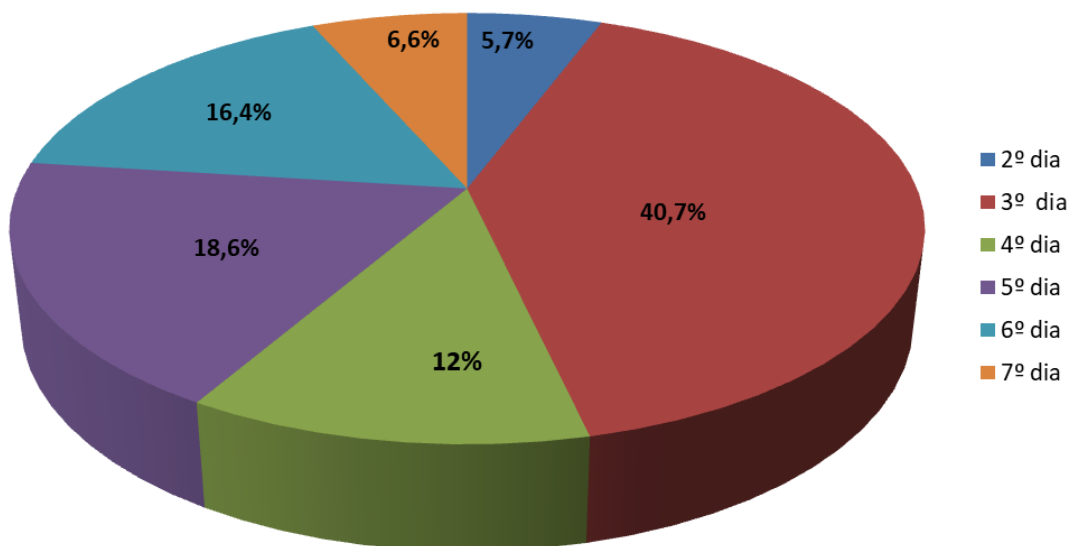


Figura 18 - Porcentagem de morte embrionária calculada em dias após isolamento das amostras.

O terceiro período pós-inoculação em que houve maior morte embrionária foi o 2º dia, com 16,4% (112/683) de mortes dos embriões de galinha inoculados.

As menores taxas de morte embrionária ocorreram durante o 6º e o 7º dia após a inoculação, com 5,7% (39/683), e 6,6 % (45/683), respectivamente (Figura 18).

5.2 Isolamento em cultura celular BHK-21 - formação do banco viral

A amostragem total analisada pelo isolamento em cultura celular BHK-21 foi resultante da formação de diferentes “pools” das 150 amostras positivas isoladas em OEG. Estes “pools” foram formados conforme a amostra inoculada, o dia em que o embrião morreu, a passagem viral da amostra (Figura 19), e os sinais clínicos que o embrião apresentava, resultando em 662 diferentes amostras provenientes do isolamento em OEG. Assim, o total de amostras analisadas pelo isolamento em cultura celular foi de 662 amostras.

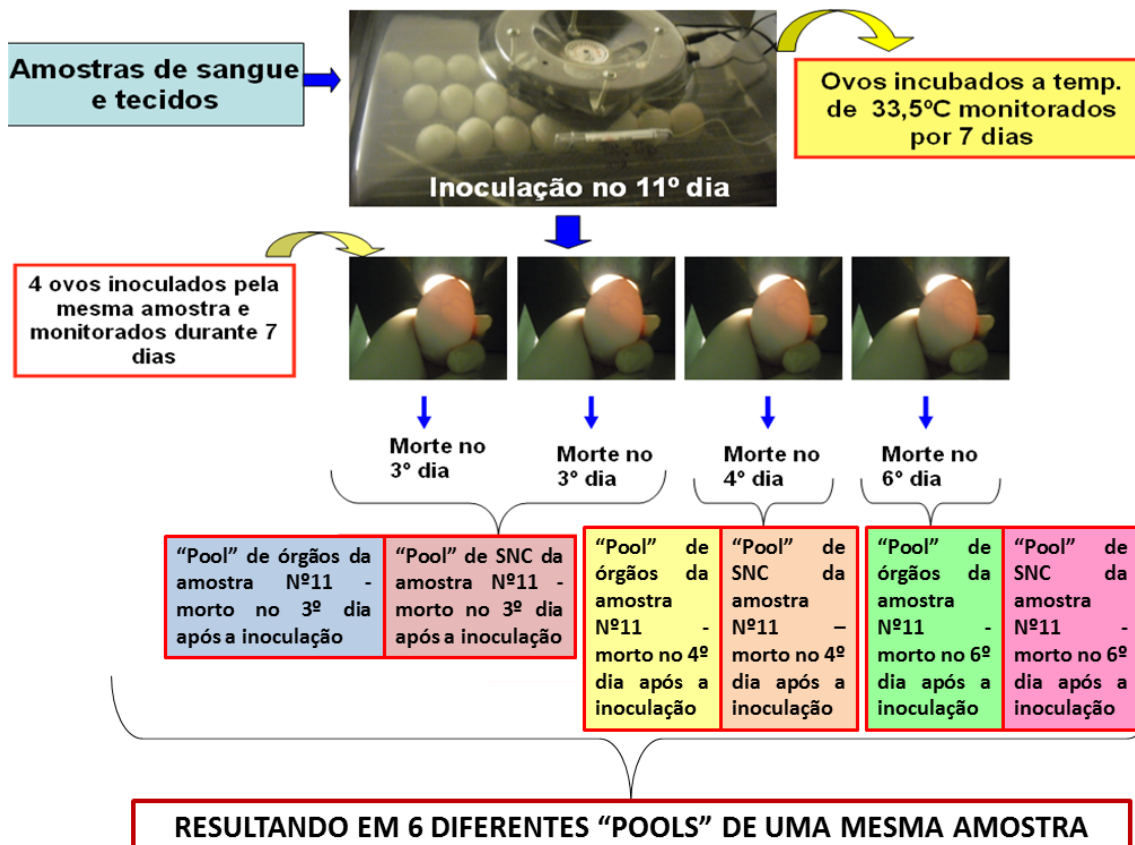


Figura 19-Esquema ilustrativo exemplificando a formação da coleção de amostras decorrentes do isolamento em OEG.

Fonte: Lima, 2013.

Todas as amostras passaram por três passagens consecutivas em célula, para a observação de efeito citopático (ECP). As amostras sem ECP foram consideradas negativas para VLA, conforme Figura 20.

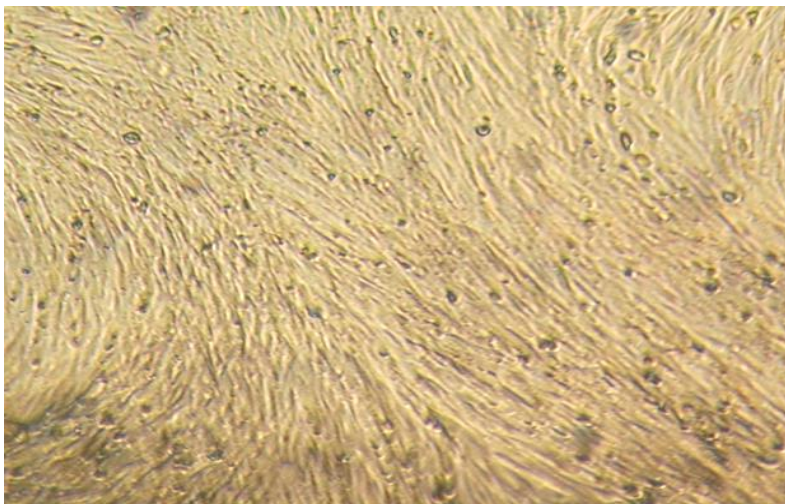


Figura 20: Célula BHK-21, controle negativo, 20x.

Fonte: Lima (2017).

As amostras positivas apresentaram ECP, caracterizado por células com alterações morfológicas: refringência, arredondamento, individualizadas ou agrupadas na monocamada celular, conforme Figuras 21 e 22.

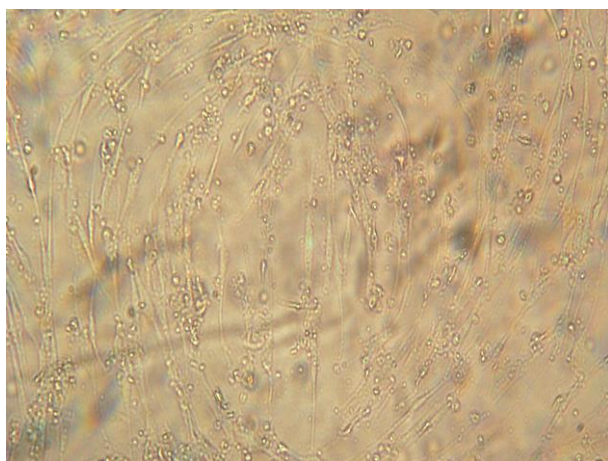


Figura 21 - Efeito citopático do VLA da amostra positiva LVB-14 9961 ("Pool" de órgãos - OEG), ECP observado três dias após a infecção celular em BHK-21. 20X.

Fonte:Lima (2017).

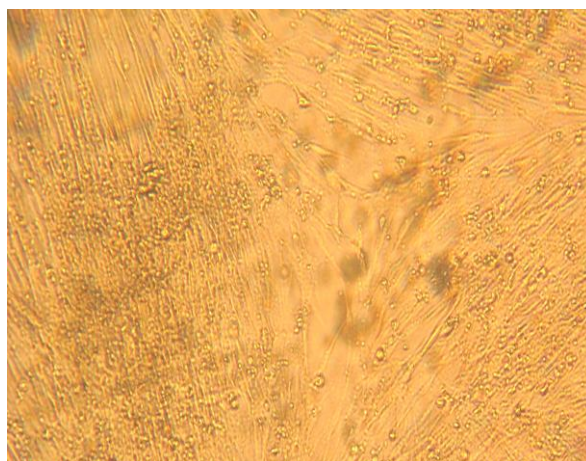


Figura 22 -Efeito citopático do VLA, amostra positiva, quatro dias após a infecção em cultura celular BHK-21, 20x.

Fonte: Lima (2013).

A adaptação dos isolados de OEG para cultura celular BHK-21 foi de 75,2% (498/662), ou seja, a grande maioria dos isolados apresentaram ECP (Figura 21 e 22).

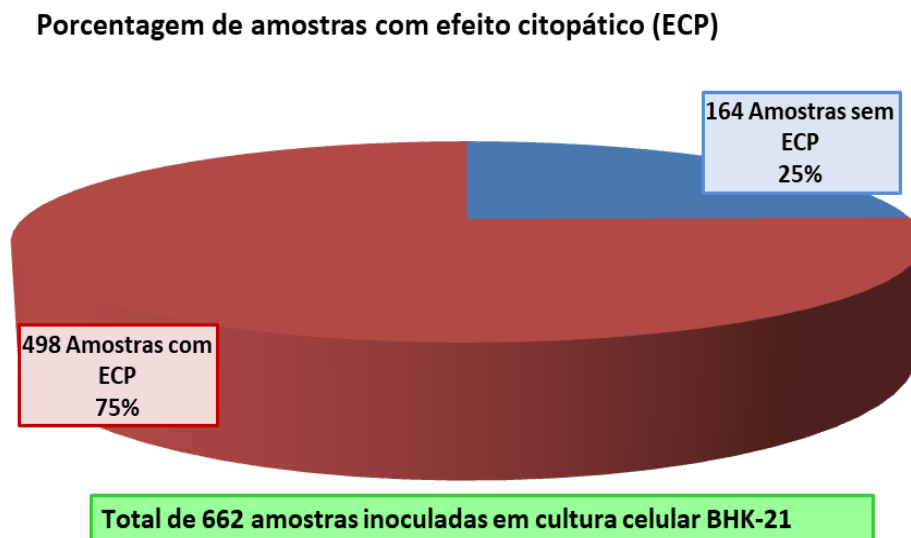


Figura 23 - Porcentagem de amostras analisadas pelo isolamento em cultura celular, BHK-21.

As amostras decorrentes dos isolamentos realizados em OEG que foram inoculadas e morreram nos quatro primeiros dias pós inoculação, quando inoculadas em cultura celular, atingiram ECP entre o 3º e 4º dia após serem inoculadas em monocamada de célula BHK-21.

Do total de amostras que apresentaram efeito citopático, cerca de 75% (374/498), ocorreram entre o 3º e 5º dias após a inoculação. Este ECP (Figuras 21 e 22) é caracterizado inicialmente pelo surgimento de focos onde as células vão apresentar arredondamento e refringência, posteriormente, estes focos rapidamente aumentam até ao ponto de ruptura, depois se destacam e flutuam livremente no meio de cultura (CLAVIJO et al., 2000).

Todo os resultados referentes ao isolamento tanto em OEG, bem como em cultura celular, foram confirmados, posteriormente, pelas técnicas de RT-PCR e RT-qPCR.

5.3 Sequenciamento

5.3.1 PCR

No total foram enviadas 256 amostras ao IZSAM, com o objetivo de sequenciar as amostras com maior concentração de RNA viral. Assim, preconizou-se o envio das amostras isoladas, contudo, as amostras que o isolado possuía menor concentração viral, enviou-se uma fração da amostra matriz.

Após a realização da primeira RT-qPCR no IZSAM, constatou-se que das 256 amostras enviadas, apenas 40,7% (104/256) apresentavam condições adequadas para serem sequenciadas (valor de Ct inferior a 35). Com base nos resultados das análises prévias ao sequenciamento (quantificação, amplificação, purificação do material genético e PCRq), constatou-se que dos 40,7% (104/256) de amostras com Ct inferior a 35, apenas 28% (71/256) poderiam ser sequenciadas, pois apresentavam boas concentrações e qualidade do RNA viral, conforme discriminado na Figura 24.

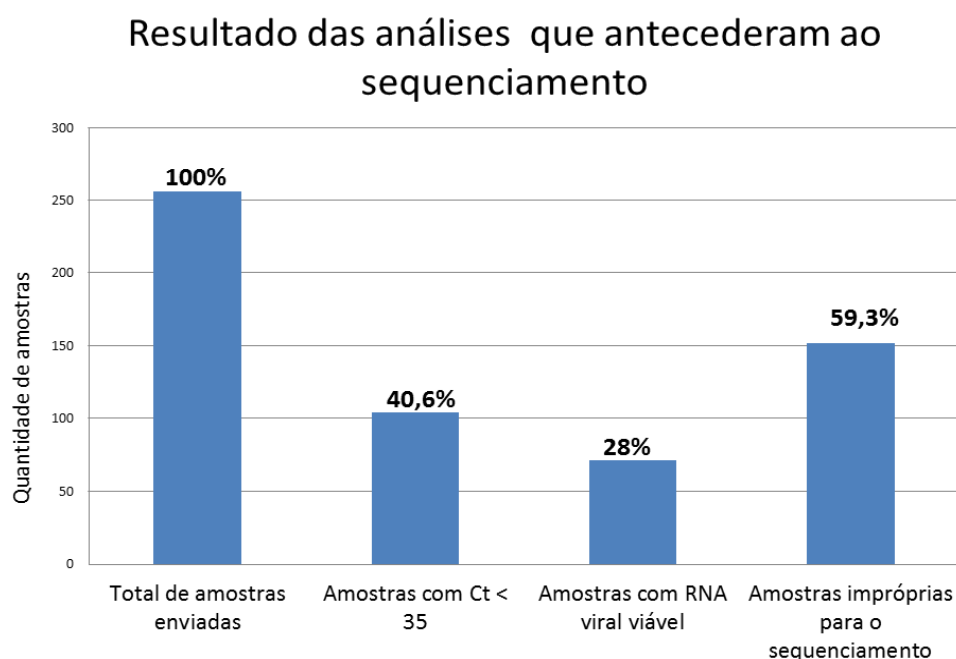


Figura 24 - Descrição dos resultados das análises realizadas para otimização da qualidade do material genético.

Todas as “reads” de seqüências dos 10 segmentos genômicos do VLA obtidas foram analisadas no departamento de bioinformática, e das 71 amostras sequenciadas, obteve-se resultados satisfatórios em 81,7% das amostras (58/71).

Os resultados obtidos após as análises de bioinformática foram separados conforme a tipificação, a partir de sequências completas do segmento 2 (região ORF da proteína VP-2), e tabulados conforme a espécie animal, cidade e Estado de origem do animal e sorotipo identificado, os resultados estão e dispostos conforme Tabela 21 em Anexo 2.

Os resultados obtidos com a análise de dados do sequenciamento revelaram a circulação do VLA sorotipos BTV-1, BTV-3, BTV-4, BTV-8, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-12, BTV-13, BTV-14, BTV-18, BTV-19, BTV-22 e BTV-24, em amostras sequenciadas de ovinos, bovinos, cervídeos e de um caprino do Estado de São Paulo e de ovinos do Estado do Rio de Janeiro.

5.3.2 Análises das sequências

As sequências obtidas foram verificadas no BLAST, e obteve-se de 86 a 100% de identidade com os respectivos sorotipos dos vários isolados do VLA depositados no “GenBank”, comprovando a confiabilidade das sequências obtidas.

Após o alinhamento das sequências, observou-se que para alguns sorotipos (BTV-1, BTV-4 e BTV-12), algumas amostras sequenciadas possuíam baixa confiabilidade nas porções finais do segmento genômico, quando comparadas com as sequências de referência. Por esta razão, nas análises realizadas neste estudo, procedeu-se com sequências genômicas homólogas, alinhadas, sem “stop codon” de 2000 pb, obtidas apenas do segmento 2. As amostras que possuíam sequências não confiáveis foram excluídas, pois inviabilizariam o melhor aproveitamento no estudo comparativo. As sequências utilizadas como referência para os sorotipos do VLA estão disponíveis na Tabela 22, Anexo 3

Os valores obtidos da análise de identidade deduzida entre as sequências das amostras analisadas e as referências para os 28 sorotipos do VLA estão dipostos no Anexo 4 (Tabela 23). Os resultados da porcentagem de diferença entre as sequências comparadas foram analisados por sorotipo sequenciado e estão apresentados nas Tabelas 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

Tabela 7 - Porcentagens da diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-1.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”		
Registro	Cidade-UF/ Espécie	África do Sul (Nº AJ585122)	África do Sul (Nº AJ585110)	Austrália (Nº KM00995381)
LVB-13 4175	VPF - RJ/ovina	12,85%	12,45%	26,15%
LVB-14 9946	Nova Odessa - SP /ovina	59,94%	59,48%	62,6%
LVB-14 9947	Nova Odessa - SP /ovina	45,83%	45,58%	52,81%
LVB-14 9949	Nova Odessa - SP /ovina	13,5%	13,1%	26,6%
LVB-14 9984	Araçatuba - SP/ovina	12,85%	12,5%	25,6%
LVB-14 9985	Araçatuba - SP/ovina	35,79%	35,34%	44,32%
LVB-15 462	VPF -RJ/ovina	55,87%	56,17%	57,68%

O BTV-1 foi detectado em ovinos nos Municípios de Nova Odessa e Araçatuba no Estado de São Paulo e também em uma única propriedade do Vale do Paraíba Fluminense (VPF), no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 8 - Porcentagem da diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP2 para o sorotipo BTV3.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”
Registro	Cidade-UF/ Espécie	Itália, Alemanha, França (Nº KP821039.1)
LVB-14 9990	Itapetininga - SP/ovina	7,03%

O BTV-3 foi detectado apenas em ovinos de duas propriedades, uma localizada no Município de Itapetininga, e a outra localizada no Município de Nova Odessa, no Estado de São Paulo, contudo, apenas a amostra LVB-14 9990 foi analisada, em decorrência à qualidade das sequências obtidas.

Tabela 9 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-4.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”			
Registro	Cidade-UF/ Espécie	Itália, Grécia e Israel (Nº DQ191277)	África do Sul (Nº AJ585125)	Argentina (Nº JX024955)	Grécia, Itália e Turquia (Nº KP821055)
LVB-13 1709H	Araçatuba - SP/ovina	10,79%	10,74%	11,39%	10,69%
LVB-13 1709 I	Araçatuba - SP/ovina	9,94%	9,89%	10,54%	9,89%
LVB-14 1574	Jaboticabal - SP /cervo	35,19%	35,14%	34,38%	35,09%
LVB-14 9976	Nova Odessa - SP /ovina	51,95%	51,9%	51,15%	51,8%
LVB-14 9977	Sorocaba - SP /ovina	43,27%	43,22%	42,21%	43,17%
LVB-14 9980	Araçatuba - SP/ovina	10,09%	10,04%	10,64%	9,99%

O BTV-4 foi detectado em três espécies diferentes no Estado de São Paulo: em ovinos, em propriedades localizadas no Município de Araçatuba e Sorocaba, em um caprino de uma propriedade no Município de Itu, em um cervídeo no Município de Jaboticabal. No Estado do Rio de Janeiro, o BTV-4 foi detectado em ovinos e em um bovino na região do VPF.

Tabela 10 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-9.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	Equador (Nº KX442583)	África do Sul (Nº AJ585130)
LVB-13 4170	VPF - RJ/ovina	10,79%	12,29%

No período referente à amostragem estudada, o BTV-9 foi detectado em um ovino em uma propriedade localizada na região do VPF, no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 11 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-10.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”		
Registro	Cidade-UF/ Espécie	Índia (Nº KP339245)	Índia (Nº JQ740772)	África do Sul (Nº AJ585131)
LVB-14 2680	VPF - RJ/ovina	10,44%	7,88%	12,24%
LVB-14 2682	VPF - RJ/ovina	10,40%	7,83%	12,24%
LVB-14 1575	Jaboticabal - SP/cervo	34,23%	33,88%	33,83%

O BTV-10 foi detectado em três ovinos de uma única propriedade da região do VPF, no Estado do Rio de Janeiro, e em um cervídeo de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Tabela 12 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-12.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	Grécia, Itália e Turquia (Nº KX164090)	Estados Unidos (Nº KP821100)
LVB-13 4058	VPF - RJ/ovina	13,9%	12,19%
LVB-13 4073	VPF - RJ/ovina	13,4%	14,85%
RAG09 1398	Martinópolis - SP/bovina	12,34%	11,94%
LVB14 16185	Sertãozinho - SP/bovina	13%	12,45%
LVB-14 9953	Nova Odessa - SP/ovina	14,3%	14,35%
LVB-14 9956	Nova Odessa - SP/ovina	15,06%	73,34%
LVB-14 9974	Araçatuba - SP/ovina	13,1%	12,34%
LVB-14 9989	Itapetininga - SP/ovina	13%	73,59%

No Estado de São Paulo, o BTV-12 foi detectado em duas espécies: bovina nos municípios de Sertãozinho e Martinópolis, sendo o primeiro detectado em um touro, e o segundo em um feto; na espécie ovina o BTV-12 foi detectado em propriedades dos Municípios de Nova Odessa, Araçatuba e Itapetininga. No Estado do Rio de Janeiro, o mesmo sorotipo foi detectado em ovinos de uma mesma propriedade, localizada na região do VPF.

Tabela 13 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-13.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	Estados Unidos (Nº DO01531)	África do Sul (Nº AJ58513)
PAG-08 12	Itu - SP/caprina	72,99%	72,93%

O BTV-13 foi detectado apenas em um caprino, no Município de Itu, Estado de São Paulo.

Tabela 14 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-14.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	África do Sul (Nº AJ585135)	Estados Unidos (Nº KX164110)
LVB-15 2732	Sertãozinho - SP/bovina	9,28%	8,53%

O BTV-14 foi detectado apenas em bovinos, no Município de Sertãozinho, Estado de São Paulo.

Tabela 15 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-18.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	África do Sul (Nº AJ585139)	Estados Unidos (Nº KX164110)
LVB-13 30267	Jaboticabal - SP/cervo	12,4%	26,1%
LVB-14 2180	VPF - RJ/ovina	12,8%	32,1%
LVB-14 4430	VPF - RJ/ovina	12,09%	22,09%

O BTV-18 foi detectado em um cervídeo, no Estado de São Paulo, em Jaboticabal, e em três ovinos de uma mesma propriedade no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 16 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-19.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	África do Sul (Nº AJ 585140)	África do Sul (Nº JK272430)
LVB-13 30290	Jaboticabal - SP/cervo	68,27%	67,92%
LVB-15 2073	Sertãozinho - SP/bovina	63,05%	63,9%
LVB-15 2247	Sertãozinho - SP/bovina	63,25%	63,5%

O BTV-19 foi detectado em um cervídeo, no Município de Jaboticabal, e em dois touros de Sertãozinho no Estado de São Paulo.

Tabela 17 - Porcentagens de diferença de identidade entre sequências genômicas da proteína do VP-2 para o sorotipo BTV-22.

Identificação das amostras		País de origem e número de acesso do “GenBank”	
Registro	Cidade-UF/ Espécie	África do Sul (NºAJ 585141)	Estados Unidos (Nº KX164140)
LVB-13 10359	Castilho - SP/cervo	28,61%	10,14%
LVB-13 30292	Jaboticabal - SP/cervo	12,34%	9,78%
LVB-13 30304	Jaboticabal - SP/cervo	12,14%	27,3%
LVB-13 9970	Itapetininga - SP/ovina	15,01%	13,55%

O BTV-22 foi detectado em três cervídeos de Jaboticabal, em um cervídeo no Município de Castilho, e em um ovino no Município de Itapetininga, no Estado de São Paulo.

Também foram detectados os sorotipos BTV-8, BTV-11 e o BTV-24, contudo, devido à má qualidade e baixa confiabilidade das sequências, as mesmas não foram incluídas na análise de identidade e confecção das árvores filogenéticas. O BTV-8 foi encontrado em três cervídeos, no Município de Jaboticabal, o BTV-11 foi detectado apenas em um ovino no Município de Sorocaba, e o BTV-24 foi detectado apenas em um ovino, no Município de Araçatuba, Estado de São Paulo.

5.3.3 Análises filogenéticas

A primeira árvore obtida sob condições de máxima verossimilhança, a partir da análise das amostras sequenciadas, com as referências para os 28 sorotipos do VLA, foi construída utilizando como critério de otimização nas análises filogenéticas, o modelo matemático evolutivo de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + I + G, onde os parâmetros de

substituição foram: InL = -121016.0938, valor de I = 0,0040, valor de G = 1,7278 com “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados (Figura 34–Anexo 5).

Devido à variabilidade que as sequências obtidas no presente estudo apresentaram, quando comparadas com as sequências depositadas “GeanBank”, foi realizada a análise das sequências dos sorotipos por sorogrupo.

Na construção da árvore filogenética, referente às amostras sequenciadas pertencentes ao sorogrupo “A” (BTV-4, BTV-10, BTV11, BTV17, BTV-20 e BTV-24) foi utilizado como critério o modelo matemático evolutivo de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + I + G. Os parâmetros de substituição foram: INL= - 29267. 8398, valor de I = 0,0062 o valor de G = 0,954 e número de passos = 8515 com “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 70% foram representados (Figura 25).

SOROGRUPO A

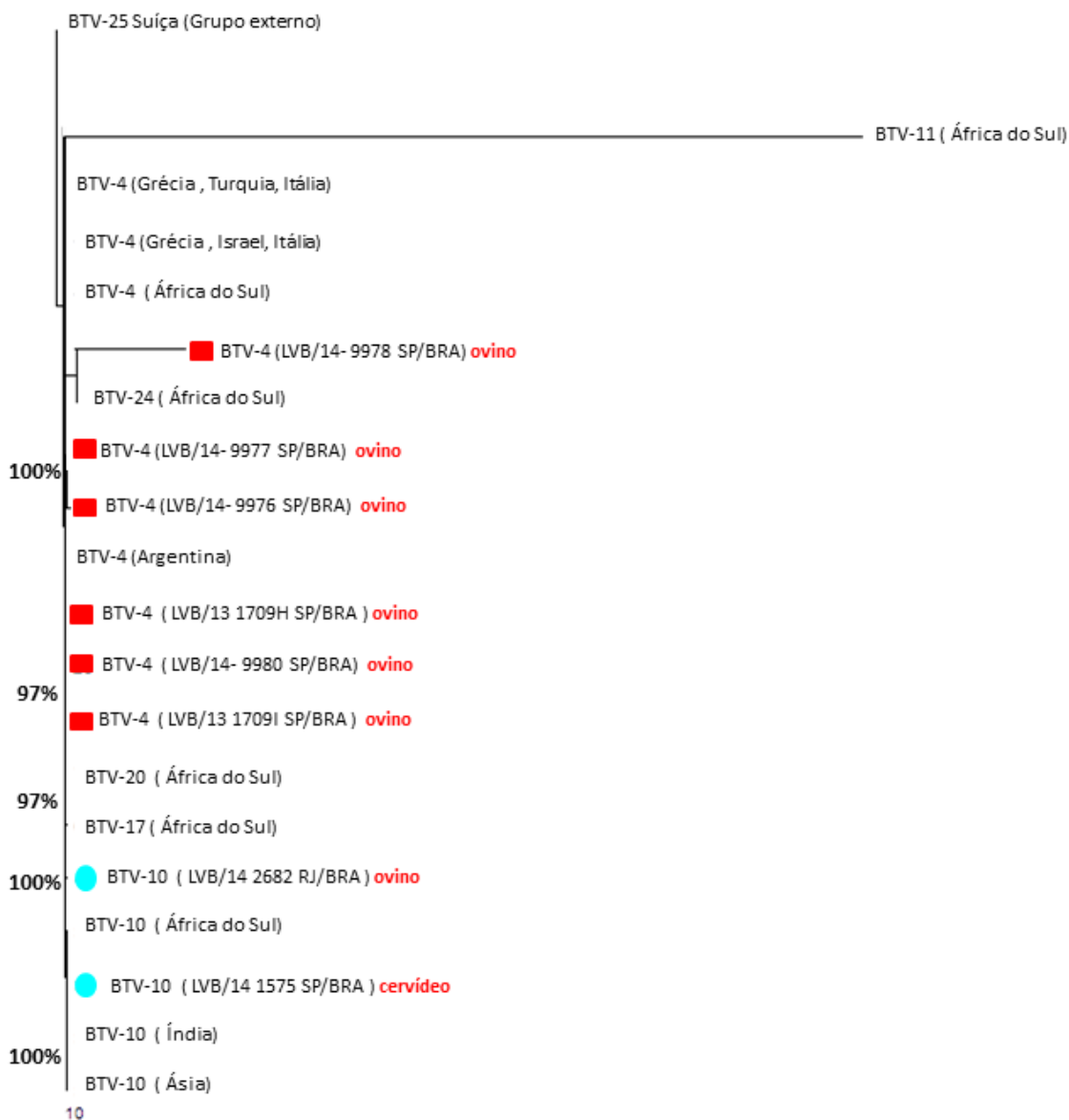


Figura 25 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa PAUP, sob o critério da máxima verossimilhança, após determinar o modelo de reconstrução filogenética de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + I + G, do alinhamento de múltiplas seqüências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BT-4, BT-10, BT-11, BT-17, BT-20 e BT-24 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “A”. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas referentes ao sorotipo BT-4 estão sinalizadas com um quadrado vermelho, as amostras pertencentes ao BT-10 estão sinalizadas com um círculo na cor verde-piscina.

Para a reconstrução das árvores filogenéticas, referentes às amostras sequenciadas pertencentes ao sorogrupo “B” (BT-3, BT-13 e BT-16), “C” (BT-6, BT-14 e BT-21), “D” (BT-8, BT-18, BT-23), “E” (BT-5 e BT-9), “F” (BT-7 e BT-19), “H” (BT-1) foi utilizado o modelo matemático evolutivo de substituição de nucleotídeo Maximum Likelihood Tree, com “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram aceitos (Figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 32 respectivamente).

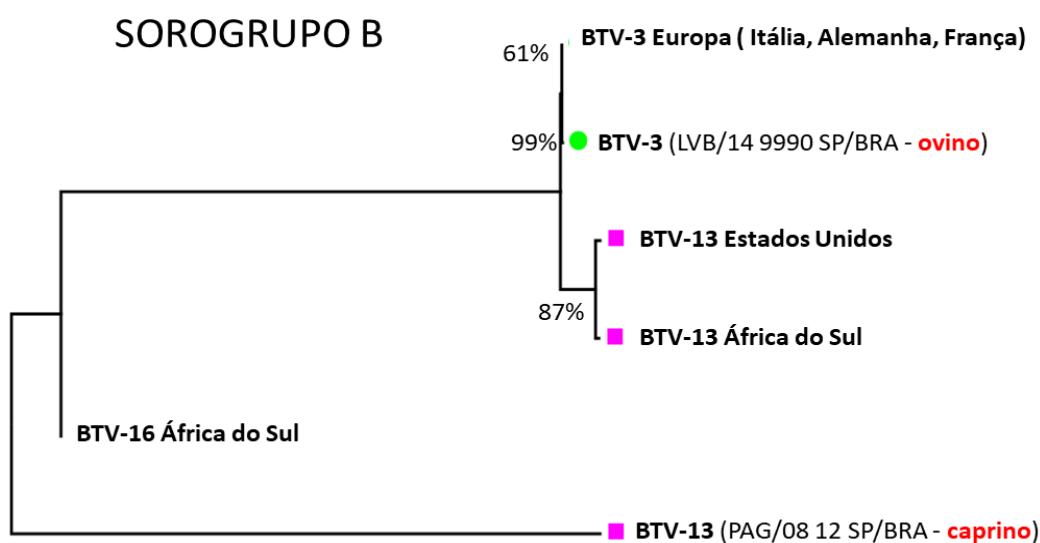


Figura 26 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-3, BTV-13, e BTV16 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “B”. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas referentes ao BTV-3 estão sinalizadas com um círculo verde, e as amostras pertencentes ao BTV-13 estão sinalizadas com um quadrado na cor “pink”, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados

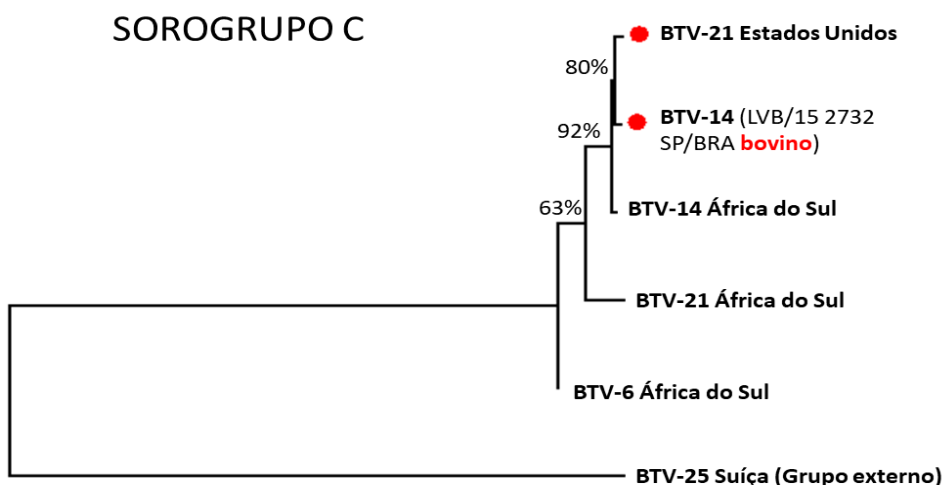


Figura 27 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-6, BTV-14, e BTV21 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “C”, utilizou-se também o sorotipo BTV-25 como grupo externo. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que a amostra sequenciada referente ao BTV-14 está sinalizada com um círculo vermelho, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados.

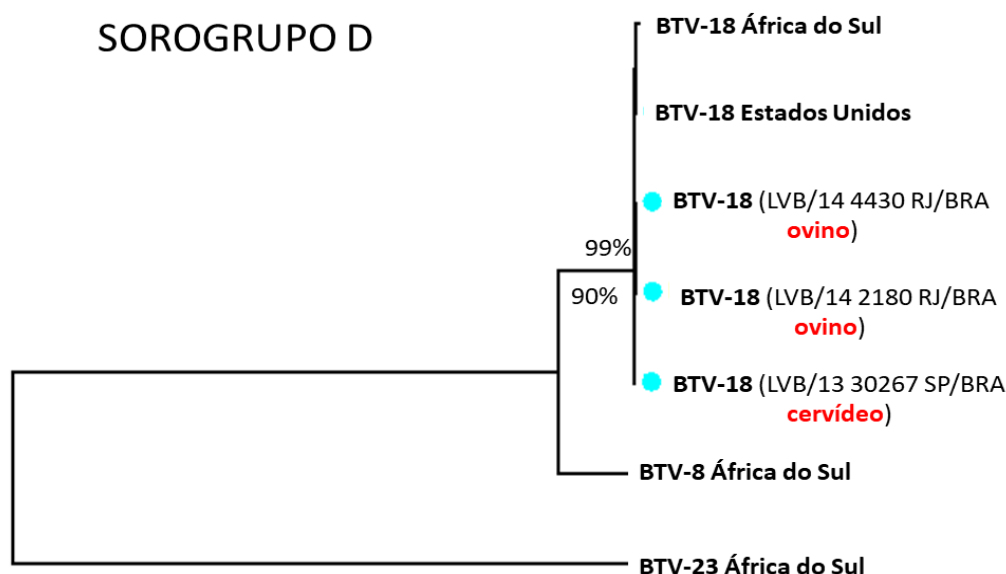


Figura 28 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-8, BTV-18, e BTV23 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “D”. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas são referentes ao BTV-18 e estão sinalizadas com um círculo na cor verde-piscina, com valor de bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados. Somente valores acima de 60% foram representados

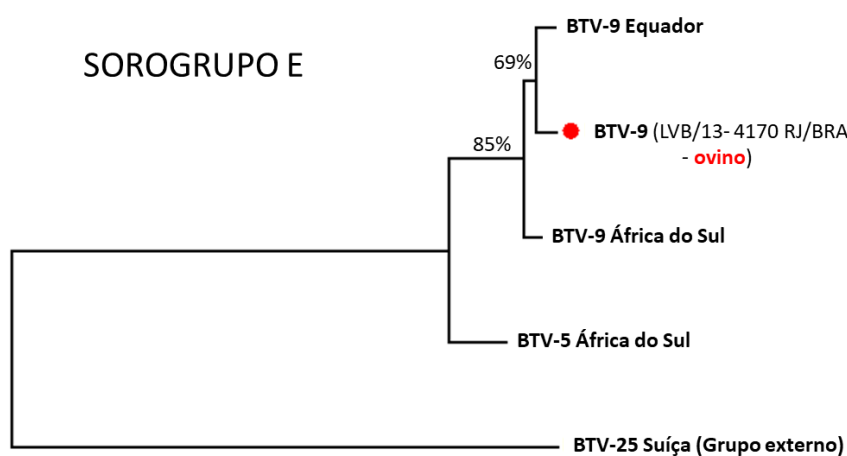


Figura 29 - Árvore filogenética construída com o auxílio do Programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-5 e BTV-9 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “E”, utilizou-se também o sorotipo BTV-25 como grupo externo. As amostras sequenciadas neste estudo foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e /a espécie animal sendo que a amostra sequenciada referente ao BTV-9 está sinalizada com um círculo vermelho, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados.

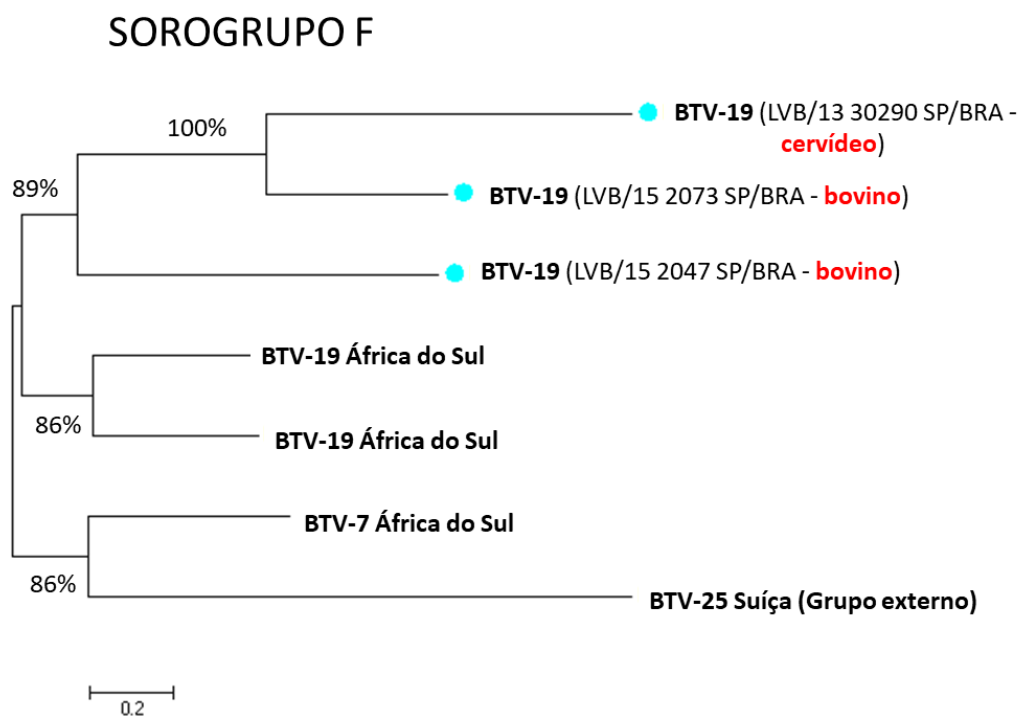


Figura 30 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa MEGA 7.0 sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas sequências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BTV-7 e BTV19 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “F”, utilizou-se também o sorotipo BTV-25 como grupo externo. As amostras sequenciadas, referentes ao BTV-19 foram destacadas e identificadas com o n° de registro, a origem, e a espécie animal e sinalizadas com um círculo na cor verde-piscina, com valor de bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados.

Na construção da árvore filogenética, referente às amostras sequenciadas pertencentes ao sorogrupo “G”, foi utilizado como critério o modelo matemático evolutivo de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + G, os parâmetros de substituição foram: valor de G = 1,8238 e valor de INL= -15139 . 9785 (Figura 31).

SOROGRUPO G



Figura 31 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa PAUP, sob o critério da máxima verossimilhança, após determinar o modelo de reconstrução filogenética de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + G, do alinhamento de múltiplas seqüências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipos BT-12 e BT-22 do VLA, pertencentes ao sorogrupo “G”, utilizou-se também o sorotipo BT-8 como grupo externo. As amostras sequenciadas foram destacadas e identificadas com o nº de registro, a origem e a espécie animal, sendo que as amostras sequenciadas referentes ao BT-12 estão sinalizadas com um triângulo azul escuro, e as amostras pertencentes ao BT-22 estão sinalizadas com quadrado na cor verde-piscina, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas.

SOROGRUPO H

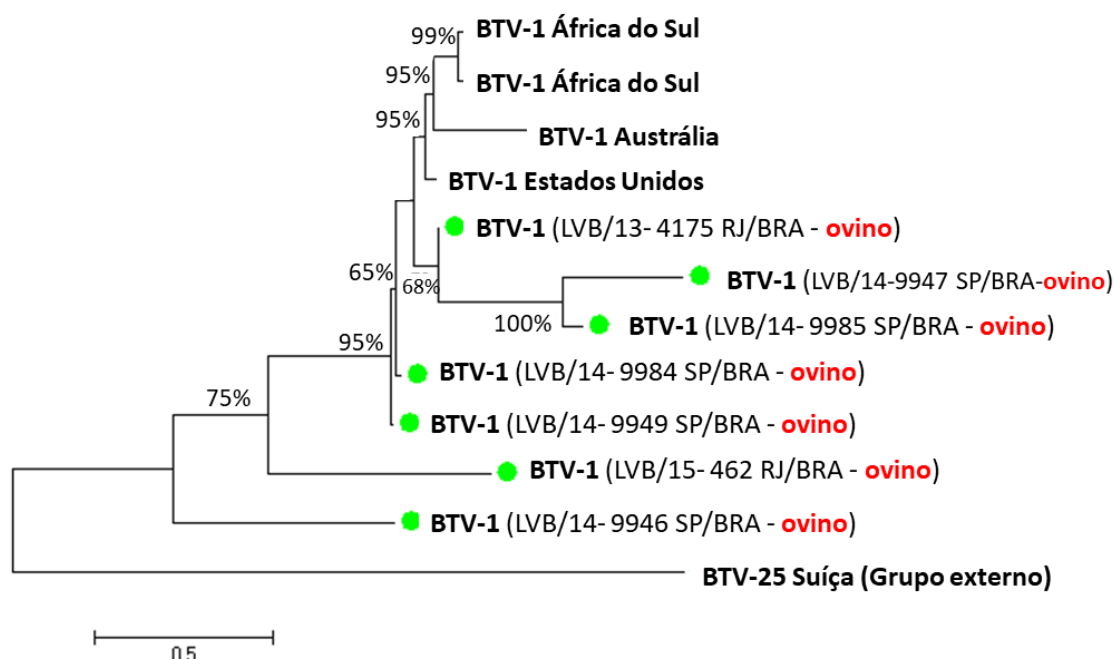


Figura 32 - Árvore filogenética construída com o auxílio do programa MEGA 7.0, sob o critério da máxima verossimilhança, para o alinhamento de múltiplas seqüências de nucleotídeos da proteína VP-2 dos sorotipo BTV-1 do VLA, pertencente ao sorogrupo “H”. As amostras sequenciadas foram destacadas e identificadas com o n° de registro, a origem e a espécie animal, e estão sinalizadas com um círculo verde, com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram representados

5.4 Análise Climática

Os municípios com resultados satisfatórios no sequenciamento foram classificados conforme a classificação de Köppen-Geiger, em quatro diferentes tipos de clima, porém todos com características favoráveis à proliferação de vetores, como umidade e calor (Tabela 18).

Tabela 18 - Caracterização climática dos municípios com amostras sequenciadas

Estado	Município	Classificação Climática
São Paulo	Araçatuba	Caracterizado por altas temperaturas, clima tropical chuvoso com inverno seco e mais frio, com temperaturas médias superiores a 18°C.
São Paulo	Castilho	
São Paulo	Itapetininga	Caracterizado por possuir faixas de clima tropical, com verão quente, sem estação seca de inverno.
São Paulo	Itu	
São Paulo	Martinópolis	
São Paulo	Nova Odessa	
São Paulo	Sorocaba	Caracterizado por chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C, sendo característico de clima tropical de altitude.
São Paulo	São Paulo	
São Paulo	Sertãozinho	
São Paulo	Jaboticabal	
Rio de Janeiro	VPF	Caracterizado por possui clima temperado úmido com inverno seco (> 10 °C) e verão temperado (superior a 22 C°)

5.4.1 Municípios do Estado de São Paulo

Os resultados referentes à temperatura média e a média precipitação dos municípios do Estado de São Paulo, no período em que foram coletadas as amostras, estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19 - Temperatura média, precipitação média e mês/ano conforme a data da colheita das amostras por município do Estado de São Paulo.

Município	Mês/Ano da colheita	Temperatura Média (°C)	Precipitação Média (mm)
Araçatuba	Agosto – 2007	22,7	0
	Fevereiro – 2008	26,3	122
	1º semestre – 2009	27,2	128
Castilho	Novembro – 2009	29,1	120
Itapetininga	Abril – 2008	21,3	108,7
Itu	Março – 2008	25,2	119
Jaboticabal	2013	22,3	132
Martinópolis	Novembro – 2009	30	121
Nova Odessa	Abril – 2008	22,2	143,3
Sertãozinho	Abr./2014-Dez./2015	27,6	156
Sorocaba	Março – 2008	23,9	93,2

Fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO)

Todos os municípios analisados, exceto Araçatuba no período de agosto de 2007, apresentaram períodos chuvosos e quentes nas respectivas datas em que foram encaminhadas amostras com ou sem suspeita clínica para LA. Nos Municípios de Jaboticabal e Sertãozinho, as chuvas se concentraram principalmente nos meses de verão (dezembro, janeiro e fevereiro), e nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro ocorreram também às médias mais elevadas de temperaturas.

5.4.2 Região do Vale do Paraíba Fluminense – Rio de Janeiro

Foi realizada a análise climática com o objetivo de avaliar as condições climáticas no período em que foram registrados os surtos da doença na região. Para isso, foram coletados e analisados dados de precipitação e temperatura médias da estação meteorológica 83409 correspondente ao município de Paty de Alferes, onde foram identificados os casos positivos (Tabela 20).

A estação meteorológica do município Paty de Alferes foi selecionada, pois apresentou os registros completos para os anos de interesse.

Tabela 20 - Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total de município de Paty de Alferes nos anos de 2013, 2014 e 2015.

Meses	Precipitação Total	Temperatura Max.	Temperatura Min.	Temperatura Média
Janeiro	86,2	31,23	18,8	24,1
Fevereiro	104,8	33,44	18,8	25,4
Março	135,2	30,93	19,1	23,7
Abril	131,7	29,51	18,9	24,2
Mai	62,4	27,71	16,8	21,1
Junho	12,8	25,2	14	18,8
Julho	17	24,86	11,6	17,24
Agosto	10	26	13	18,2
Setembro	7	26,7	10,7	17,4
Outubro	88	27,92	15,5	21,7
Novembro	27,3	29,9	17,5	22,6
Dezembro	254,5	30	20,8	23,7

O climograma do Município de Paty de Alferes, localizado no Vale do Paraíba Fluminense, com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total nos anos de 2013, 2014 e 2015, está representado na Figura 33.

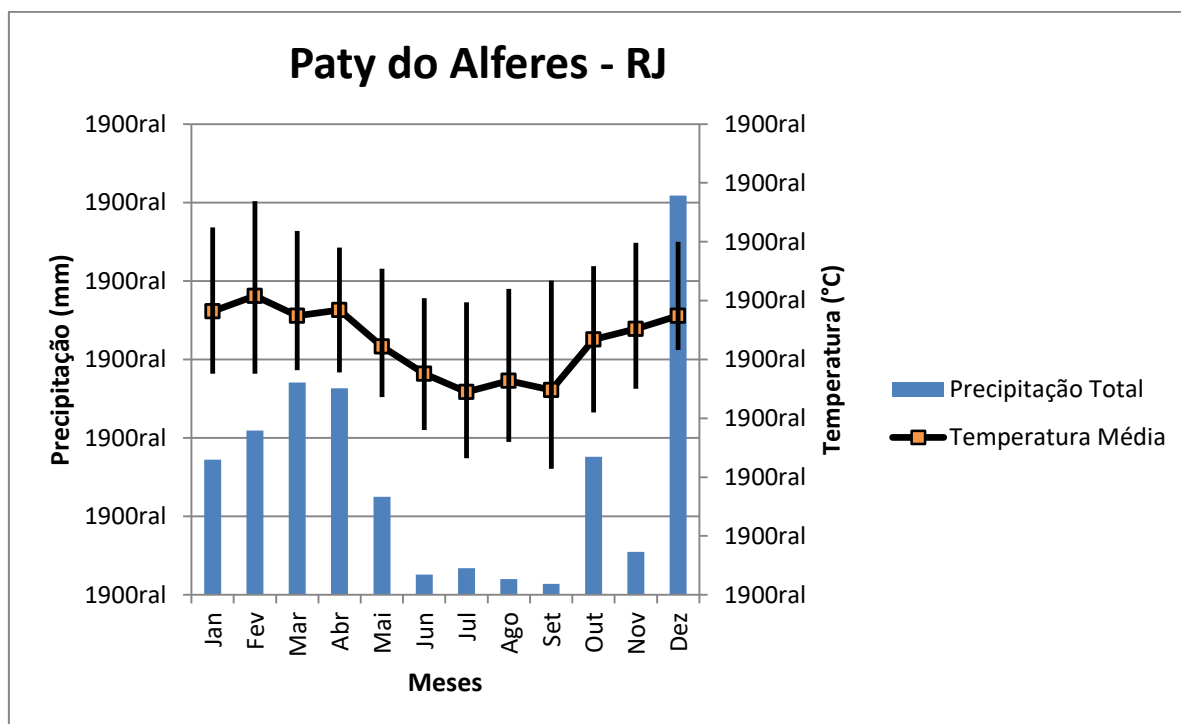


Figura 33 - Climograma do município de Paty de Alferes-RJ, com médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) total nos anos de 2013, 2014 e 2015.

6. DISCUSSÃO

6.1 Isolamento em OEG

A etapa de inoculação da amostra de sangue ou tecido em OEG foi considerada importante para o isolamento viral e posterior adaptação do VLA isolado em células BHK-21. Este protocolo foi efetivo, mesmo tratando-se de amostras estocadas por quase 10 anos.

Considerando que aproximadamente 81% (207/256) do total da amostragem utilizada no presente estudo foi inoculada em OEG, e que das 207 amostras inoculadas obteve-se sucesso em quase 73% (150/207), esta etapa do trabalho atingiu resultados bastante satisfatórios.

Os resultados obtidos referentes aos isolamentos em OEG em primeira e segunda passagem, nos quais 85% (127/207) do total das amostras positivas inoculadas nos embriões foram capazes de provocar alterações macroscópicas visíveis nos mesmos, demonstraram a alta sensibilidade deste método para o isolamento do VLA (CLAVIJO et al., 2000). Outros resultados que reforçam a sensibilidade da técnica para o isolamento do VLA foram os resultados obtidos com a mortalidade embrionária calculada em dias após a inoculação, onde quase 50% (337/684) dos embriões morreram entre o segundo e o quarto dia após a inoculação, sendo que o período em que houve maior morte embrionária 40,64% (278 / 684) foi entre o 3º e 4º dia após inoculação. Todos estes resultados foram confirmados posteriormente pela técnica de RT-qPCR.

Dos 634 embriões de galinha inoculados, mais de 77% apresentaram lesões macroscópicas, tais como retardo no desenvolvimento embrionário, teratogenia, anasarca, hepatomegalia, esplenomegalia, edema cerebral e pontos hemorrágicos disseminados pelo corpo. Estas lesões observadas nos embriões estão de acordo com os poucos dados encontrados em literatura (CLAVIJO et al., 2000), que demonstram o padrão de lesão em embriões de galinha quando inoculados pelo VLA.

A adaptação das amostras do VLA isoladas em OEG à cultura celular BHK-21, foi considerada um sucesso, sendo observada a presença de efeito citopático em mais de 75% (498/662) das amostras passadas em células. Ressalta-se ainda que essas mesmas amostras foram positivas também na RT-qPCR.

Estes resultados são bastante satisfatórios, tendo em vista as dificuldades do isolamento do VLA a partir de amostras clínicas coletadas de animais naturalmente

infectados. Afshar (1990) relata que grande parte da dificuldade para isolar o VLA a partir de amostras clínicas coletadas de animais naturalmente infectados se dá pela necessidade de amplificar o vírus em tecido embrionário (OEG) por via intravenosa, antes de adaptar a cultura celular BHK-21. Segundo Clavijo et al. (2000), o diagnóstico laboratorial do VLA é um procedimento muito laborioso, pois exige pessoal bem treinado, além de ter um bom entendimento de todo o procedimento de isolamento.

Os dados desta pesquisa corroboram com essas afirmações, tendo em vista que este procedimento adequado foi realizado, inoculando a amostra clínica em OEG para amplificação viral e posterior adaptação em BHK.

6.2 Isolamento em cultura celular BHK-21

O LVB/IB mantém uma coleção viral com cerca de 300 amostras positivas para o vírus da língua azul, detectadas desde 2005. Estas amostras destinam-se ao estudo sobre a biologia destes vírus, virulência, patogenicidade e aplicação em desenvolvimento de vacinas.

A caracterização dessas amostras é fundamental para preencher lacunas do conhecimento sobre a doença no Brasil e seus efeitos na pecuária. Esta pesquisa iniciou os estudos e obteve resultados satisfatórios no isolamento e identificação de sorotipos presentes no país.

Das 150 amostras isoladas e mantidas no banco viral, foram enviadas alíquotas de apenas 120 isolados, pois se priorizou o envio ao IZSAM de amostras com maior concentração de partículas virais, com a finalidade de otimizar a caracterização do perfil genético das mesmas. Dessa forma, o RNA viral dos isolados foi quantificado pela RT-qPCR e comparado com as respectivas “amostras originais - matriz”, sendo que em 30 desses isolados, foi preferível enviar alíquotas da “amostra original” por possuírem Ct igual ou inferior a 35.

A técnica da RT-qPCR foi repetida no IZSAM, para confirmar presença do gene NS3 do VLA bem como a qualidade do RNA das amostras enviadas, sendo constatado que apenas 41% (104/256) das amostras apresentavam condições adequadas para sequenciamento. Acredita-se que a perda de qualidade das amostras tenha sido em decorrência aos problemas alfandegários ocorridos no transporte do Brasil para a Itália, em que as amostras demoraram por volta de 30 dias para chegarem ao IZSAM, permanecendo por este período em TRizol®, sem o devido acondicionamento sob-refrigeração.

Mesmo com a problemática da degradação do RNA viral devido ao longo período em que as amostras foram mantidas em TRizol® a temperatura ambiente, foi possível sequenciar 71 das 104 amostras que apresentavam boas concentrações de RNA viral, e estabelecer o perfil molecular das estirpes do VLA em 54 dessas amostras.

6.3 Sequenciamento

Das 71 amostras sequenciadas, foi possível obter a caracterização filogenética de 82% (58 amostras), as análises filogenéticas revelaram a circulação do VLA sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-3, BTV-4, BTV-8, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-12, BTV-13, BTV-14, BTV-18, BTV-19, BTV-22 e BTV-24, em ovinos, bovinos, cervídeos e caprinos, pertencentes aos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

6.3.1 Análise filogenética por sorotipo

O VLA possui ampla distribuição em todo o mundo, diversos estudos filogenéticos têm comprovado que os diferentes sorotipos do VLA evoluíram separadamente, com variantes regionais, criando recombinações conforme a “pressão de seleção”, também chamados topotipos, para cada segmento genômico (MATOS et al., 2016). O VLA pode ser distinguido também em “topotipos leste”, referindo-se aos topotipos com origem oriental, e “topotipo oeste”, para os grupos ocidentais (MAAN et al., 2008)

Na América do Sul, inquéritos sorológicos indicaram que a circulação de VLA é de ampla distribuição (LOBATO et al., 2015). Na Guiana Francesa, oito sorotipos (BTV-1, BTV-2, BTV-6, BTV-10, BTV-12, BTV-13, BTV-17 e BTV-24) foram isolados de ruminantes assintomáticos ou mesmo com sinais clínicos leve da doença (VIAROUGE et al., 2014). O sorotipo BTV-4 foi isolado no norte da Argentina (LEGISA et al., 2013) e no sudeste do Brasil (GROOCOCK; CAMPBELL 1982; LIMA 2013; BALARO et al., 2014), o sorotipo BTV-12 foi isolado em diversos surtos da doença no sul do Brasil (CLAVIJO et al., 2002; ANTONIASSI et al., 2010). Recentemente, o sorotipo BTV-17 foi isolado e caracterizado a partir de amostras clínicas de ovinos, em um surto de LA no Estado do Rio Grande do Sul em 2014 (MATOS et al., 2016). Vários sorotipos do VLA (BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22) foram descritos e isolados no Brasil associados a óbitos de cervos da espécie *Mazama nana* em 2015 e 2016 (OIE 2016). Embora hajam vários isolados

do VLA da América do Sul, as sequências completas do genoma viral referente a estes isolados não estão disponíveis, tendo poucas informações genéticas sobre os sorotipos que aqui circulam (LEGISA et al., 2013; MATOS et al., 2016).

As análises das sequências de nucleotídeos e filogenética referentes ao BTV-1 sugerem variações de identidade dentro do mesmo sorotipo. As variações de similaridade foram detectadas em ovinos, em uma única propriedade no Município de Nova Odessa. Os isolados brasileiros LVB-14 9946 e LVB-14 9947 apresentaram valores de identidade semelhantes (LVB-14 9946 - 60%, 59,5%, e 62,6% e o isolado LVB-14 9947 - 46%, 46%, 53%), respectivamente, quando confrontadas com as três principais sequências de referência para o BTV-1 utilizadas no estudo (Nº AJ585122 - África do Sul, NºAJ5851110 África do Sul e Nº KM00995381 - Austrália). Os valores das duas amostras analisadas sugerem baixa identidade com as amostras de referência. Esses dados, juntamente com a análise dos outros segmentos genômicos, sugerem que a linhagem do BTV-1 referente aos isolados das amostras LVB-14 9946 e LVB-14 9947 surgiram através de recombinações gênicas de outras linhagens do VLA que circulam nas Américas.

O isolado LVB-14 9949, quando comparado com as referências da África do Sul (NºAJ585122, NºAJ5851110), apresentou alto percentual de similaridade, indicando uma identidade de nucleotídeos de aproximadamente 87% com as linhagens de referência africana. A mesma amostra, quando comparada com a referência de origem australiana (Nº KM00995381), apresentou 73,4% de similaridade. Estes resultados sugerem um provável topotipo de BTV-1 americano, com provável origem sul-africana.

Todas as amostras analisadas procedentes do Município de Nova Odessa-SP foram coletadas em um único período, sendo assim, os resultados sugerem circulação de pelo menos duas diferentes linhagens de BTV-1 em uma única propriedade.

As análises filogenéticas do BTV-1 detectado em dois ovinos (LVB14 9984 e LVB-14 9985) da mesma propriedade, pertencentes ao Município de Araçatuba-SP mostraram os diferentes percentuais de identidade para o sorotipo em um período de seis meses. A amostra LVB-14 9984, coletada no período de agosto de 2007 apresentou pouco mais de 87% de identidade com as linhagens sul-africanas e aproximadamente 74% de identidade com a linhagem australiana, e a amostra LVB-14 9985 coletada em fevereiro de 2008 apresentou percentuais mais distantes das referências, cerca de 64% de identidade com as linhagens sul-africanas e 55,7% de identidade com a linhagem australiana.

Assim como no Município de Araçatuba-SP, na região do VPF, no Estado do Rio de Janeiro, também foi possível verificar a variabilidade do BTV-1, durante o período de dois anos em que a região foi monitorada. Baseando-se também na análise dos demais segmentos genômicos sequenciados, acredita-se que estas diferenciações gênicas observadas sejam o resultado das recombinações ocorridas em uma mesma população, com sucessivos rearranjos no genoma viral. Sendo que o isolado da amostra LVB-13 4175 coletada em fevereiro de 2013, apresentou identidade de quase 88% com as linhagens africanas, e 74% de identidade com a linhagem australiana. Após quase dois anos, houve outro foco da doença na mesma propriedade, com animais manifestando diversos sinais clínicos característicos de LA, período em que a amostra LVB-15 462 foi coletada, detectando um sorotipo BTV-1 diferente, esta nova linhagem apresenta apenas 44% de identidade com as linhagens africanas, e 42% com a australiana. Na análise da árvore filogenética do sorogrupo “H” (Figura 32), todos os isolados das amostras brasileiras são basais as principais linhagens referência do BTV-1 depositadas no “GenBank”. Estes resultados sugerem que a origem do BTV-1 encontrado nos Estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, provenha das divergências e convergências evolutivas originadas de recombinações gênicas de diferentes linhagens do VLA circulantes nas Américas. Esta diferenciação e variabilidade gênica dos isolados brasileiros do BTV-1 é também confirmada pela dispersão dos mesmos na topografia da árvore filogenética (Figura 34– Anexo 5).

Segundo Nomikou et al. (2015), devido a sua ampla distribuição, o BTV-1 expressa diferentes particularidades e características de virulência e patogenicidade que variam conforme a pressão de seleção imposta pelo meio (região, vetores, hospedeiros, outros sorotipos e/ou topotipos circulantes).

Este é o primeiro relato do VLA sorotipo-1 nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, sendo este sorotipo considerado exótico no país (OIE, 2016).

A análise filogenética do BTV-3, isolado e caracterizado a partir da amostra de um ovino do Município de Itapetininga-SP, revelou alto percentual de identidade 93% com isolados do BTV-3 (Nº KP 821039.1) de países da Europa (Itália, França, Alemanha), Turquia e países da região mediterrânea da África. Os resultados obtidos sugerem pouca diferenciação no Seg-2 da proteína VP2, com os diferentes isolados da linhagem de referência para o BTV-3. Na análise da árvore filogenética do sorogrupo “B”, o isolado LVB-14 9990 formou um grupo-irmão com o BTV-3 usado como referência, como valor de “bootstrap” de 99% . Estes dados sugerem uma provável origem europeia para o BTV-3 encontrado no Município de

Itapetininga. Este sorotipo já havia sido relatado no Estado do Paraná, em uma reserva ecológica, após a infecção e morte de um veado da espécie *Mazama nana* (OIE, 2016).

Os resultados obtidos das análises filogenéticas da caracterização do BTV-4 provenientes de ovinos dos Municípios de Araçatuba, Nova Odessa, e Sorocaba, e de um cervídeo do Município de Jaboticabal, demonstraram a grande variabilidade gênica que o sorotipo apresenta, sugerindo a circulação de três diferentes linhagens de BTV-4 no Estado de São Paulo. As amostras isoladas e caracterizadas provenientes de ovinos do Município de Araçatuba (LVB-13 1709H, LVB-13 1709I e LVB-14 9980), apresentaram valores de identidade próximos, quando comparadas com as linhagens de referência para o BTV-4 isolado na Itália, Grécia e Israel (Nº DQ 191477) 89%, África do Sul (Nº AJ585125) 90%, Argentina (Nº JX 024955) 89%, e Grécia, Turquia e Itália (Nº KP821055) 89,9%, estes resultados sugerem a formação de uma linhagem para o sorotipo 4. Os isolados do BTV-4, provenientes dos Municípios de Nova Odessa (LVB-14 9976) e de Sorocaba (LVB-14 9977) demonstraram valores de identidade de aproximadamente 48% e 57% respectivamente para os quatro isolados de referência, estes dados sugerem uma segunda linhagem de BTV-4. O isolado do BTV-4, do cervídeo (LVB-14 1574), do Município de Jaboticabal, sugere 65% de identidade com as linhagens de referência, indicando a formação de uma provável terceira linhagem do BTV-4 circulante no Estado de São Paulo.

A análise filogenética dos 10 segmentos dos isolados LVB-13 1709H, LVB-13 1709 I, LVB-14 9976 e LVB-14 9977, bem como as informações epidemiológicas sobre a ocorrência de outros sorotipos do VLA nas respectivas propriedades reforçam a ideia de que esta variabilidade encontrada nos isolados brasileiros do BTV-4 surgiu em decorrência a diversas recombinações gênicas com outras linhagens, e outros sorotipos do VLA que circulam nas Américas, Europa e África, bem como das diversas interações entre o vírus, os vetores competentes, e a espécie hospedeira. Todos estes fatores contribuíram para o surgimento destas prováveis três linhagens diferentes de BTV-4, encontradas no Estado de São Paulo. Segundo Maan et al. (2007; 2010), diferentes sorotipos podem ser perpetuados dentro de ecossistemas diversos e em regiões geográficas distintas por diferentes espécies de vetores, induzindo à variações como sucessivos rearranjos no genoma viral. Estudos moleculares realizados com todos os 10 segmentos do genoma viral, em diferentes isolados, de diversas regiões onde ocorreu a doença, mostraram significativas variações nas sequências de nucleotídeos, que parcialmente se correlacionam com as origens geográficas do vírus evidenciando a pressão de seleção dos fatores ambientais e ecológicos de cada região, bem

como o surgimento de gerações de linhagens do VLA geograficamente distintas (MAAN et al., 2007; 2010).

Estas diferenciações podem ser visualizadas na árvore filogenética do sorogrupo “A” (Figura 25), com a formação de dois grandes grupos-irmãos. No primeiro grande grupo, houve a formação do grupo com os isolados de referência da Grécia, Israel, Itália e Turquia com o isolado da África do Sul. O segundo grupo-irmão foi formado entre o isolado de referência para o BTV-24 da África do Sul, com o isolado do BTV-4 da amostra LVB-14 9978, com notória diferença de comprimento de ramo do isolado brasileiro. Na análise filogenética do segmento 6 deste isolado detectou-se o sorotipo 24. Outro grupo-irmão foi formado pelos isolados LVB-14 9977 e LVB-14 9976, a partir da primeira ramificação deste grupo. O segundo grande grupo foi formado pela amostra de referência do BTV-4 isolada da Argentina, que faz par monofilético com o isolado LVB-13 1709H, que se ramifica, formando um grupo-irmão entre os isolados LVB-14 9980 e LVB-13 1709I. Este mesmo perfil de variabilidade foi observado na outra árvore filogenética (Figura 34– Anexo5).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram, de maneira inédita, a variabilidade gênica do sorotipo 4 no Estado de São Paulo, com quatro prováveis linhagens diferente do BTV-4. O BTV-4 já havia sido isolado e caracterizado por RT-qPCR em ovinos e caprinos no Estado de São Paulo (LIMA, 2013), entretanto este é o primeiro relato em cervídeo da espécie *Mazama gouazoubira*.

O BTV-9 detectado em ovinos, no Estado Rio de Janeiro, possui identidade de quase 90% de similaridade com o BTV-9 isolado no Equador (Nº KX442583) e 87% de identidade com o sorotipo isolado na África do Sul (Nº AJ585130), sugerindo que o BTV-9 isolado no Estado do Rio de Janeiro possui um topotipo de origem ocidental. Devido à alta taxa de variabilidade gênica, alguns sorotipos do VLA possuem também subclassificações, em leste para os topotipos que fazem parte do grupo de origem oriental, e oeste para os topotipos do grupo ocidental (NOMIKOU et al., 2015). Na análise da árvore filogenética do sorogrupo “E” (Figura 29), o isolado brasileiro (LVB-13 4170) formou um grupo-irmão com o isolado do Equador, e este grupo está parafiético ao BTV-9 isolado na África do Sul. O BTV-9, assim como o BTV-3 foram relatados em cervídeos de uma reserva ecológica, no Estado do Paraná, após terem sido isolados e identificados, posterior à infecção e morte dos cervos da espécie *Mazama nana* (OIE, 2016).

Os resultados obtidos para o BTV-10 sugerem duas linhagens diferentes para este sorotipo, a primeira, detectada em um touro, no Município de Sertãozinho, Estado de São

Paulo que apresentou aproximadamente 66% de identidade com as linhagens de referência, de origem indiana (Nº KP339245 e PQ740772) e sul-africana (Nº AJ585131), enquanto que o BTV-10 analisado a partir de amostras de ovinos do Estado do Rio de Janeiro apresentou 89,6% de identidade com a linhagem Nº KP339245 e 92% de identidade com a linhagem Nº PQ740772, ambas indiana, e 87,7% de identidade com a linhagem sul-africana. Na análise da árvore filogenética do sorogrupo “A” (Figura 25), o BTV-10, isolado a partir da amostra LVB-14 2682 se tornou basal aos outros isolados, incluindo os isolados usados como referência para este sorotipo. A partir deste isolado foi formado o grupo monofilético composto pelo isolado referência da África do Sul e pelo grupo parafilético formado pelo isolado da amostra LVB-14 1575 e pelos dois isolados da Índia, que formaram entre si um grupo-irmão. O BTV-10 é considerado um sorotipo exótico no Brasil (OIE, 2016), contudo, o mesmo já foi reportado em touros, no Estado de Minas Gerais (GASPARINI et al., 2014). Este é o primeiro trabalho a relatar o BTV-10 em touros no Estado de São Paulo e em ovinos no Estado do Rio de Janeiro.

O BTV-12 foi detectado em bovinos e ovinos, em propriedades localizadas nos municípios de Martinópolis, Sertãozinho, Nova Odessa, Araçatuba e Itapetininga, no Estado de São Paulo, e em ovinos do Estado do Rio de Janeiro. Apesar do grande número de animais portadores do BTV-12, e de sua ampla distribuição pelos diversos municípios analisados neste estudo, os resultados filogenéticos sugerem pouca variabilidade gênica do BTV-12, durante o período de cinco anos em que se detectaram os animais positivos analisados. Em média, as amostras estudadas apresentaram identidade de 86,5% com o BTV-12, isolado na Grécia, Itália, França e Turquia (Nº KX 164090). Quando comparadas com a linhagem de referência do BTV-12 isolada nos Estados Unidos (Nº KP821100), as amostras apresentaram identidade de 87%. As duas exceções foram as amostras LVB-14 9956 e LVB-14 9989, ambas da espécie ovina, provenientes dos municípios de Nova Odessa e Itapetininga, respectivamente, que apresentaram apenas 26% de similaridade com o isolado, sugerindo baixa identidade. Na análise da árvore filogenética do sorogrupo “G” (Figura 31), as amostras pertencentes ao BTV-12 formaram dois distintos grupos, monofilético. O primeiro grupo formou-se tendo como sequência basal o BTV-12, isolado em países da Europa e Turquia, que posteriormente deu origem ao isolado dos Estados Unidos, que é basal às amostras brasileiras (LVB-13 4173, LVB-13 4058 e RAG09 1398), e ainda neste grupo, os isolados das amostras LVB-13 4058 e RAG09 1398 formaram um grupo-irmão. O segundo grupo foi formado apenas pelos isolados brasileiros, onde a amostra LVB-14 16185, isolada de um

bovino do Município de Sertãozinho, foi basal às demais amostras, descendente a esta, e a amostra LVB-14 9974 originou o grupo-irmão do BTV-12 formado pelos isolados LVB14 9953 e LVB14 9956. O BTV-12 já havia sido relatado nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul, sendo este o primeiro relato do BTV-12 nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

Os resultados filogenéticos do BTV-13 detectado em um caprino, no Município de Itu, Estado de São Paulo, sugerem baixa identidade, aproximadamente 27% com as amostras de referência para o sorotipo 13 isolado nos Estados Unidos (Nº DO01531) e África do Sul (Nº AJ585134), indicando que a linhagem do BTV-13 (PAG-08 12) tenha surgido a partir de recombinações gênicas de outras linhagens do VLA que circulam na América do Sul. Outra possível explicação seriam as prováveis recombinações gênicas entre as linhagens do VLA e o hospedeiro da espécie caprina. Caprinos e bovinos são refratários à doença, entretanto, servem de reservatório para o VLA e pouco se conhece sobre as interações e recombinações do VLA nesta espécie (SAMAL et al., 1987; STOTT et al., 1987). Estes resultados são evidenciados na análise da árvore filogenética do sorogrupo “B” (Figura 26), em que o isolado brasileiro mostra-se basal a todos os demais isolados, inclusive a isolados de outros sorotipos (BTV-3, BTV-16) pertencentes a este sorogrupo. Quando analisado em conjunto com todas as amostras utilizadas neste estudo (Figura 34 Anexo 5), a amostra PAG-08 12 se diferencia de tal modo que passa a integrar outro sorogrupo, descendendo de um grupo parafilético resultante de isolados brasileiros do BTV-2. Este é o primeiro relato do BTV-13 no Brasil (OIE, 2016).

O BTV-14, detectado a partir de amostras de um touro do Município de Sertãozinho, Estado de São Paulo, demonstrou 91,5% de identidade na comparação das sequências de nucleotídeos do Seg-2, do BTV-14 isolado nos Estados Unidos (Nº KX164110), e 90% de identidade com o BTV-14 isolado na África do Sul (Nº AJ585135). Os resultados sugerem que o sorotipo 14 detectado em Sertãozinho, tenha uma provável origem norte americana ou sul-africana. Na análise da árvore filogenética do sorogrupo “C” (Figura 27), a amostra brasileira forma um grupo irmão com a amostra isolada nos Estados Unidos, e este clado tem como ancestral o isolado sul-africano. O BTV-14 foi relatado em cervos no Estado do Paraná (OIE, 2016), sendo este o primeiro relato do sorotipo na espécie bovina, no Estado de São Paulo.

O BTV-18 foi caracterizado a partir de amostras de um cervídeo do Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, e de amostras de dois ovinos do Estado do Rio de Janeiro. A análise filogenética do Seg-2 mostrou pouca variabilidade gênica entre os três isolados,

onde os mesmos apresentaram valores de identidade próximos (87,6% e 73,2%) quando confrontados com as referências para o BTV-18 isolados na África do Sul (Nº AJ 585139) e Estados Unidos (Nº KX164110), respectivamente. Estas características de identidade podem ser visualizadas na árvore filogenética do sorogrupo “D” (Figura 28), com a formação de um único grupo monofilético para o sorotipo 18. O BTV-18 foi descrito em um cervídeo da espécie *Mazama nana*, no Estado do Paraná (OIE, 2016), sendo este o primeiro relato do BTV-18 em um cervídeo da espécie *Mazama gouazoubira*, no Estado de São Paulo e em ovinos no Estado do Rio de Janeiro.

O BTV-19 foi caracterizado a partir de amostras de um cervídeo no Município de Jaboticabal, e a partir de amostras de touros pertencentes ao Município de Sertãozinho. Os resultados das análises filogenéticas sugerem pouca variabilidade gênica entre as amostras, mesmo pertencendo a municípios e espécies diferentes. Quando confrontadas com os isolados de referência sul-africanos (Nº AJ585140 e Nº JK 272430), o BTV-19 encontrado no cervídeo apresentou valores de identidade de 32% de similaridade, o BTV-19, caracterizado a partir de amostras de touros do Município de Sertãozinho, apresentou valores de identidade próximos de 36,55%. Esta pouca variabilidade gênica entre os isolados brasileiros e baixa identidade com os isolados de referência, podem ser visualizados na análise da árvore filogenética do sorogrupo “F” (Figura 30), com a formação de dois distintos grupos monofiléticos. O primeiro grupo foi formado apenas com as amostras brasileiras, onde a amostra LVB-15 2047 aparece de forma basal aos isolados LVB-13 30290 e LVB-15 2073, sugerindo ser um ancestral comum entre os outros dois isolados. Apesar dos isolados LVB-13 30290 e LVB-15 2073 terem formado um único grupo, a amostra LVB-13 30290 apresentou uma diferenciação de ramo, esta característica pode ser atribuída ao fato de serem sorotipos isolados a partir de espécies e regiões diferentes. Este sorotipo já foi relatado em um cervídeo da espécie *Mazama nana*, no Estado do Paraná (OIE, 2016), este é o primeiro relato do sorotipo 19 em cervídeo da espécie *Mazama gouazoubira*, e bovinos no Estado de São Paulo.

Os resultados filogenéticos do BTV-22 detectado apenas no Estado de São Paulo sugere discreta diferenciação do sorotipo. As amostras analisadas eram provenientes de cervídeos nos municípios de Jaboticabal e Castilho, e de um ovino do Município de Itapetininga. O BTV-22 detectado nos cervídeos LVB-13 30292 e LVB-13 30304 de Jaboticabal, demonstraram 88% de identidade com os isolados do BTV-22 da África do Sul (Nº AJ585141). Quando comparados com isolados dos Estados Unidos (Nº KX164140), os isolados brasileiros apresentaram respectivamente, 90% e 73%, de identidade. O cervídeo do

Município de Castilho (LVB-13 10359) demonstrou identidade de 71% com o isolado sul-africano e 90% de identidade com o isolado dos Estados Unidos. O BTV-22 detectado no ovino (LVB-13 9970) demonstrou aproximadamente 86% de identidade com ambos os isolados (Nº AJ585141 e Nº KX164140). Estas diferenças podem ser visualizadas pela topologia da árvore filogenética do sorogrupo “G” (Figura 31). As sequências de nucleotídeos pertencentes ao BTV-22 partem de um mesmo nó, formando um único grupo monofilético, onde o isolado do cervo LVB-13 10359 apresentou-se de forma basal às demais sequências analisadas, incluindo as sequências dos isolados da África do Sul e Estados Unidos. Este resultado sugere que a mesma seja um ancestral comum para as demais sequências. As sequências referentes aos cervos (LVB-13 30292 e LVB-13 30304) formaram entre si um grupo-irmão, sugerindo a circulação de apenas uma linhagem de BTV-22 naquela região e período, para aquela população e cervídeos.

O BTV-22 já havia sido relatado também em cervídeo da espécie *Mazama nana*, no Estado do Paraná. Este é o primeiro relato do sorotipo no Estado de São Paulo, com isolamento e caracterização molecular do BTV-22 em cervídeos das espécies *Mazama americana*, *Mazama bororo* e em ovinos.

6.3.2 Análise por Município

Araçatuba – SP

No Município de Araçatuba foram detectados cinco ovinos portadores do BTV-1, quatro portadores do BTV-4, um ovino portador do BTV-12, e outro do BTV-24, totalizando 11 animais portadores de diferentes sorotipos do VLA, sem sinais clínicos da doença, distribuídos em seis diferentes propriedades do município. A coleta foi realizada em agosto de 2007 (período de seca) e fevereiro de 2008 (período chuvoso).

As análises demonstraram a ampla distribuição do BTV-1 em Araçatuba, sendo que o mesmo foi encontrado em cinco das seis propriedades estudadas. Das seis propriedades estudadas, cinco possuíam pelo menos um ovinos positivo para o VLA, evidenciando a ampla distribuição do vírus neste município. Com base em estudos sorológicos (ELISA e IDGA), Nogueira et al. (2008) constatou a prevalência do VLA mais de 60% dos ovinos do Município de Araçatuba, confirmando a disseminação VLA nesta região. Outro importante dado epidemiológico foi a detecção de até três diferentes sorotipos em uma mesma propriedade, explicando a grande variabilidade gênica encontrada nos isolados brasileiros analisados.

Nova Odessa –SP

No Município de Nova Odessa foi possível a caracterização do BTV-1 em quatro ovinos, do BTV-3 em um ovino, e do BTV-12 em outros dois ovinos. As amostras foram coletadas em abril de 2008 (período chuvoso), em uma única propriedade. Assim como em Araçatuba, no Município de Nova Odessa os sete animais positivos para o VLA, não possuíam sinal clínico da doença, evidenciando-se também a ocorrência de três diferentes sorotipos do VLA em uma mesma propriedade.

Sorocaba - SP

No Município de Sorocaba, foram analisadas amostras de ovinos provenientes de quatro propriedades, onde duas possuíam ovinos positivos para o VLA. Foram detectados e caracterizados o BTV-4 em três ovinos, e o BTV-11 e um ovino, evidenciado também no Município de Sorocaba a ocorrência de mais de um sorotipo em uma mesma propriedade. Assim como nos demais municípios, os ovinos portadores do VLA não apresentavam sinal clínico da doença, e a colheita foi realizada durante o mês de março de 2008 (período chuvoso).

Itapetininga - SP

No Município de Itapetininga, foi possível a caracterização dos sorotipos BTV-3, BV12 e BTV-22, identificados em uma única propriedade, sem sinais clínicos da doença. A colheita foi realizada no mês março de 2008 (período chuvoso).

Os resultados demonstraram a endemicidade do BTV-1 nos Municípios de Araçatuba e Nova Odessa, a endemicidade do sorotipo BTV-4 nos Municípios de Araçatuba e Sorocaba, bem como a endemicidade do BTV-12 nos Municípios de Araçatuba, Itapetininga e Nova Odessa, para os respectivos períodos em que foram coletadas as amostras utilizadas neste estudo.

Diversos estudos e inquéritos soroepidemiológicos foram realizados nestes municípios, com o propósito de investigar a presença do VLA em diferentes populações de ruminantes, contudo, os mesmos serviram apenas para estimar a porcentagem de animais sororeagentes ao VLA (NOGUEIRA et al., 2009; VENDITTI, 2009; BERNARDES, 2011) ou informar a quantidade de animais positivos para o VLA (VENDITTI, 2009), sem determinar

qual é ou quais são os sorotipos envolvidos com as respectivas populações e regiões estudadas no Estado de São Paulo.

O BTV-4 já havia sido relatado e caracterizado por Lima (2013) em um estudo realizado com 162 amostras positivas para o VLA, de ovinos da região sudeste do Brasil, em que, por meio do isolamento e da tipificação molecular, detectou o sorotipo 4 em 45% das amostras positivas. O VLA BTV-4 também já foi identificado em ovinos nos Estados do Paraná (CLAVIJO et al., 2002; LAGER 2004) Rio de Janeiro (BALARO et al., 2014), Rio Grande do Sul (ROSA et al., 2014a), e Minas Gerais (ROSA et al., 2014b).

Os resultados revelam a inédita presença dos sorotipos BTV-1, BTV-3, BTV-11, BTV-12, BTV-22 e BTV-24 em ovinos no Estado de São Paulo. Apesar de serem considerados sorotipos exóticos no país (OIE, 2016), com base nos resultados deste estudo, pode-se afirmar que os sorotipos 1, 11 e 24 já circulavam nos rebanhos de ovinos do Estado de São Paulo desde 2007, período em que iniciaram as coletas de sangue nos respectivos rebanhos.

O BTV-12 já foi relatado por Antoniassi et al. (2010), em dois surtos no Estado do Rio Grande do Sul no ano de 2009, envolvendo 106 ovinos, com a morte de 6 ovinos.

Os sorotipos 3 e 22, identificados nos Municípios de Nova Odessa e de Itapetininga, já foram descritos em cervídeos da espécie *Mazama nana*, que vieram a óbito repectivamente nos anos de 2015 e 2016, no Estado do Paraná (OIE, 2016). Contudo, os resultados obtidos revelam a presença dos dois sorotipos em rebanhos ovinos no Estado desde de 2008, ano em que foram realizadas as coletas nesses municípios.

Itu – SP

No Município de Itu, localizado na região Metropolitana de Sorocaba, no Estado de São Paulo, foram identificados e caracterizados os sorotipos 4 e 13 em duas das três amostras de sangue caprino positivas pela RT-qPCR para detecção do gene NS3 do VLA. As amostras foram enviadas em março de 2008 (período chuvoso), para diagnóstico diferencial de enfermidades infecciosas, pois nesta propriedade uma das cabras apresentava sinais clínicos de edema e abcesso em uma das orelhas.

Embora o VLA já tenha sido isolado e caracterizado em caprinos no Brasil, os resultados do presente trabalho, de maneira inédita, mostram a circulação de BTV-13 no Município de Itu, sendo este um sorotipo exótico no Brasil (OIE, 2016). Outro resultado

epidemiológico raro e importante é a presença dos sorotipos 4 e 13 em caprinos associada a manifestações clínicas da doença, o que é raro nesta espécie de ruminante.

Em 2012, Lima (2013) isolou e identificou o VLA sorotipo 4 em amostras de sangue de caprinos no Estado de São Paulo. Existem outros dois trabalhos publicados referentes à presença do VLA em caprinos no Brasil. O primeiro foi descrito por Clavijo et al. (2000), que isolaram e identificaram o sorotipo 12 durante um surto de LA no Estado do Paraná, envolvendo 130 ovinos, quatro caprinos e 70 bovinos. O segundo por Lager (2004), em dois focos ocorridos também no Estado do Paraná no ano de 2002, com a morte de 18 caprinos e nove ovinos.

O VLA também já foi descrito em caprinos em alguns estudos sorológicos, por Silva (2002), que realizou estudo no Estado do Ceará, empregando como método de diagnóstico o IDGA, constando 31% (578/1865) de caprinos sororeagentes. Outro estudo realizado no Estado de Minas Gerais (LOBATO et al., 2001), utilizando também o método IDGA, constatou 42% (623/1484) de cabras sororeagentes ao VLA. Este estudo realizado no Estado de Minas Gerais, quando comparado a outro (SILVA, 2002), também realizado no Estado de Minas Gerais, demonstra a alta dispersão do VLA nos rebanhos caprinos.

Sertãozinho – SP

No Município de Sertãozinho, localizado na região Metropolitana de Riberão Preto, no Estado de São Paulo, foram coletadas amostras de sangue de bovinos de um Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), nos períodos de maio e junho de 2014 e março e abril de 2015. Em ambos os períodos foram coletados sangue desses touros com o propósito de pré-quentena, em 2014 para exportação e comercialização de lotes de sêmen desses animais, e em 2015 com a finalidade de exportação de touros ou sêmen para Bolívia e Colômbia. Em ambos os períodos foi detectada a presença do VLA pela RT-qPCR em alguns touros. No primeiro período foi identificado e caracterizado o BTV-12 em um touro e o BTV-14 em outros dois touros, e no segundo período, identificou-se o BTV-19 em dois touros.

Os resultados obtidos a partir de amostras de touros de uma CCPS no Estado de São Paulo são inéditos, uma vez que o MAPA notificou a OIE sobre a ocorrência dos sorotipos 14 em janeiro, e do sorotipo 19 em julho de 2016, ambos detectados em cervídeos de uma reserva ecológica em Foz do Iguaçu, Estado do Paraná (OIE, 2016).

Estes resultados evidenciam a ocorrência do VLA em amostras de sangue de touros provenientes de CCPS no Brasil, comprovam a importância de se testar os touros, bem como

cada partida seminal produzida, para mitigar o risco sanitário de introdução de sorotipos de VLA por meio de sêmen contaminado.

Gasparini et al. (2014), em estudo realizado com o uso de técnicas moleculares (RT-PCR “one-step”, RT-qPCR e sequenciamento), em 53 amostras clínicas de sêmen *in natura* provenientes de animais naturalmente infectados em quatro municípios no Estado de Minas Gerais (Carlos Chagas, Pedro Leopoldo, Coronel Pacheco e Ituiutaba), detectaram 45,28% (24/53) de amostras positivas para o VLA utilizando a técnica de RT-PCR “one-step” e pela técnica da RT-qPCR 60,4% (32/53) de amostras de sêmen para o VLA. Os autores utilizaram o seg-2 (VP2) para testar as amostras de sêmen e isolados virais e comprovaram a circulação do BTV-4, mostrando também a circulação de BTV-8, BTV-10 e BTV-16 no Brasil. Estes resultados e informações epidemiológicas foram publicados em Anais na “IV Conferenza Internazionale sulla Bluetongue” realizado em Roma, na Itália em novembro de 2014, contudo os mesmos não constam como reportados à OIE, sendo assim, os sorotipos BTV-8, BTV-10 e BTV-16 são considerados ainda “exóticos” no Brasil.

Segundo Venditti (2009), que avaliou a ocorrência da LA em bovinos de Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) da região Sudeste do Brasil por meio de técnicas moleculares (uso da “nested” RT-PCR) e sorodiagnóstico (IDGA e ELISA-CFS), em que foram testadas 2268 partidas de sêmen industrializado de 404 touros, bem como 710 amostras de soro de 329 animais pertencentes a sete CCPS. Constatando alta frequência de touros portadores de anticorpos contra VLA, 74,16% (244/329), e apenas uma partida de sêmen positiva, 0,044% (1/2269). A alta frequência de touros residente em CCPS acima de 03 anos, portadores de anticorpos contra o VLA pode ser explicada, ainda segundo Venditti, pela exposição dos animais ao vírus na faixa etária de seis meses, após a queda de anticorpos colostrais, até por volta de dois anos, quando após esta idade, a maioria dos animais apresentam resposta imune ao VLA, e com isso menor risco de eliminação viral pelo sêmen, pois já soroconverteram ao sorotipo circulante na região.

No Brasil existem poucos trabalhos publicados sobre a detecção e caracterização do VLA em touros provenientes de CCPS. A maioria dos estudos realizados é para a detecção de resposta imune ao VLA (MELO et al., 2000; COSTA, 2000; COSTA et al., 2006; VENDITTI, 2009; BERNARDES, 2011).

Em bovinos, de acordo com os resultados coletados em diferentes Estados brasileiros do ano de 1980 a 2000, as prevalências de animais soropositivos variaram de 0,6% a 89%. Os menores índices foram encontrados geralmente nos Estados localizados no Sul do País, e os

mais elevados localizados, em sua maior parte na região Sudeste ou Nordeste (MELO et al., 2000). A alta frequência de ocorrência obtida nos estudos sorológicos e poucos relatos de casos clínicos da doença no campo indicam que a infecção pela LA se propaga pelos rebanhos do país de forma silenciosa (CUNHA;SOUZA; TEIXEIRA, 1988).

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo (MAPA), e devido à importância do sêmen e sua comercialização, tornou-se necessário o desenvolvimento de testes moleculares sensíveis e específicos para o diagnóstico de doenças importantes na cadeia reprodutiva bovina, como a LA, a fim de não apenas reduzir o risco de infecção, mas também de transmissão do vírus.

Martinópolis – SP

No Município de Martinópolis, localizado na região oeste do Estado de São Paulo, identificou-se o sorotipo 12 em órgãos fetais bovino. É rotina do Instituto Biológico realizar análise de fetos para confirmação de causas de doenças reprodutivas, para tanto por volta de 20 agentes infecciosos são investigados. Nos últimos 30 anos nenhum resultado confirmou o vírus da língua azul como causa de abortamento, apesar de ter sido identificado o BTV-12 em único feto. Provavelmente este foi um achado casual em vista que este sorotipo é endêmico na região e a fêmea em viremia pode infectar o feto sem, contudo, ser a causa do abortamento.

Em geral, os bovinos são considerados reservatórios assintomáticos do VLA por um longo período, representando uma ameaça às outras espécies de ruminantes susceptíveis e mais sensíveis à doença, que apresentam sinais clínicos graves e morte quando infectadas pelo VLA (COSTA et al., 2006; LOBATO et al., 2015).

A identificação do VLA em bovinos com problemas reprodutivos foi descrita na Europa em surtos da doença na década de 2000, envolvendo principalmente o sorotipo-8, o que levou a OIE a classificá-la como uma doença de caráter “re-emergente”, responsável por causar diversos prejuízos à produção bovina, como abortos, queda do desempenho reprodutivo, perda de condição corporal e redução na produção de leite (OIE, 2016).

Segundo Costa et al. (2006), as principais preocupações com a ocorrência da LA são as consequências socioeconômicas causadas pela doença na cadeia produtiva da bovinocultura devido às perdas pelas restrições na importação e exportação de animais e subprodutos (OIE, 2016).

Jaboticabal – SP

No Município de Jaboticabal, localizado na região Metropolitana de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, foi possível a identificação e caracterização dos sorotipos 4, 8, 10, 18, 19, e 22 em amostras de sangue e fragmentos de órgãos (fígado, baço, coração e pulmão) de cervídeos com e sem manifestação clínica. No Brasil, os primeiros relatos de cervídeos com sinais clínicos relacionados a LA começaram a surgir no início da década de 90, porém sem diagnóstico de agente etiológico envolvido (DUARTE; ARITA, 1992; MORATO et al., 1993; ARITA et al., 1997).

Os cervídeos pertenciam ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). As amostras de sangue foram coletadas em dois períodos diferentes, entre abril e maio de 2013, e durante o mês de janeiro de 2014, como procedimento padrão com o propósito de realizar exames de rotina.

No primeiro lote enviado de amostras de sangue, foram também encaminhados fragmentos de órgãos (fígado, baço, coração e pulmão) de um cervídeo fêmea, da espécie *Mazama gouazoubira*. Todos os fragmentos foram positivos pelo método de RT-qPCR para detecção do gene NS3 do VLA. O animal era mantido em piquete com macho da mesma espécie, mas apesar de ter ciclo estral regular nunca emprenhou. No dia 05/03/2013 foi notada alteração no comportamento, apresentando-se completamente apática, não se alimentou nem ingeriu água, sendo encontrada morta no dia seguinte. A necropsia foi realizada na UNESP, câmpus de Jaboticabal, pelo Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, e as principais alterações macroscópicas observadas foram:

- Cavidade torácica com grande quantidade de líquido sanguinolento;
- Sistema digestório: a língua apresentava a parte lateral com o tecido arroxeadado e diversas úlceras;
- Sistema respiratório: a traqueia apresentava mucosa congesta, líquido sanguinolento na luz do órgão e os pulmões apresentavam coloração vinho escuro em todo o órgão;
- Sistema cardiovascular: o coração possuía o epicárdio no ventrículo esquerdo com petéquias e estrias hemorrágicas, enquanto que o endocárdio do ventrículo esquerdo, extensas áreas hemorrágicas;
- Sistema digestório: o intestino grosso apresentava regiões com conteúdo sanguinolento;

- Sistema reprodutor: o ovário esquerdo com aumento de volume e ao corte havia conteúdo semelhante à cáseo;
- Sistema hematopoiético/linfoide: os linfonodos retrofaríngeos apresentavam acentuado aumento de volume e o linfonodo inguinal hemorrágico.

Neste primeiro lote de amostras foi possível à identificação e caracterização dos sorotipos 8, 18 e 19 em cervídeos da espécie *Mazama gouazoubira* (Veado-catingueiro), e o sorotipo 22 em um cervídeo da espécie *Mazama bororo*, (Veado-mateiro-pequeno). Estes resultados de forma inédita mostraram a circulação dos sorotipos BTV-8, BTV-18, BTV-19, e do BTV-22 em cervídeos mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo.

No segundo lote de amostras enviadas, referente ao período de janeiro de 2014, foi identificado e caracterizado VLA sorotipo 4 e 8 em dois cervídeos da espécie *Mazama gouazoubira*, e o sorotipo 10 em um cervídeo híbrido (*M. nemorivaga x gouazoubira*). Estes resultados evidenciam a possível “manutenção” do sorotipo 8 naquela população e/ou região, sendo este também o primeiro relato do VLA, sorotipos 4 e 10 em cervídeos no país.

Em um estudo sorológico realizado no NUPECCE referente aos anos de 1998 e 1999, Pandolfi (1999), comprovou a presença de anticorpos contra o VLA em 23% (5/22) dos cervídeos. Ainda segundo Pandolfi (1999), uma provável fonte de infecção para os cervídeos do NUPECCE acometidos pelo VLA, seria a circunvizinhança com outras espécies de ruminantes que viviam próximas, tendo sido detectado nestes ruminantes domésticos, alta ocorrência de anticorpos contra o VLA, principalmente em bovinos (97%, n=73) e ovinos (87%, n=54). Kawanami (2012), em um estudo retrospectivo realizado a partir de amostras de tecidos parafinizados provenientes de cervídeos necropsiados do NUPECCE, entre os anos de 1994 a 2011, detectou RNA do VLA utilizando RT-qPCR em sete animais de um total de 42 casos selecionados em que os animais apresentavam sinais clínicos de lesões sugestivas de doenças hemorrágicas.

Outro importante dado epidemiológico foi a ausência de sinais clínicos da LA, nos cervídeos infectados com os sorotipos 8, 10, 18, 19 e 22, sugerindo uma provável adaptação da população de cervídeos às linhagens virais circulantes na região.

Estes dados corroboram com os encontrados por Kawanami (2016), em um estudo epidemiológico da LA realizado no Município de Jaboticabal, com cervídeos pertencentes ao NUPECCE e com ruminantes domésticos mantidos nas proximidades, constatando-se alta soroprevalência nas espécies estudadas 38,46% (30/78) dos cervídeos, 93,18% (123/132) dos bovinos, 60,69% (105/173) dos ovinos e 23,91% (11/46) dos caprinos, bem como a detecção

do VLA, tanto em ruminantes domésticos e selvagens saudáveis, quanto em cervídeos que vieram a óbito.

Entretanto, o cervídeo macho identificado por LVB/14 1574, da espécie *Mazama gouazoubira*, após ser transferido para piquete, em área aberta, passou a manifestar sinais clínicos de LA, como edema de face e exteriorização de língua. No dia seguinte foi encontrado morto pela manhã. O VLA foi detectado pela RT-qPCR no sangue e em fragmentos de órgãos, e na tipificação realizada por sequenciamento foi possível identificar o sorotipo BTV-4. Os achados anatomopatológicos encontrados nos cervídeos na necropsia realizada na UNESP, câmpus de Jaboticabal, pelo Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, foram compatíveis com as descritas na literatura para língua azul (RADOSTIS et al., 2002; VERWOERD; ERASMUS 2004; MACLACHLAN et al., 2009; ANTONIASSI et al., 2010; LIMA 2013).

Os surtos de enfermidades hemorrágicas ocorridos em cervídeos do NUPECCE durante vários anos chegaram a gerar perda anuais de cerca de 50% do plantel. Em alguns anos, a taxa de mortalidade dos animais atingiu 90%. O principal meio de controle da enfermidade utilizado foi o uso de telas nos galpões e ectoparasiticidas a cada 15 dias durante a primavera e verão (DUARTE, 2007).

O BTV-4 é endêmico no Brasil e já foi detectado em várias regiões do Estado de São Paulo (LIMA, 2013), contudo, até o presente momento jamais relacionado à cervídeos. Conforme descrito anteriormente, embora o BTV-8 não tenha sido notificado à OIE, o mesmo foi detectado em partidas de sêmen no Estado de Minas Gerais (GASPARINI, 2014).

Já foram identificados em cervídeos da espécie *Mazama nana*, também conhecida popularmente por Veado-mão-curta, Veado-anão ou Veado-bororó-do-Sul, no Estado do Paraná a ocorrência do BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22, notificados a OIE (OIE, 2016). Este foi o primeiro trabalho a fazer a identificação, o isolamento e a caracterização molecular do VLA na espécie *Mazama gouazoubira*, popularmente conhecido por Veado-catingueiro, no Brasil.

A ocorrência do VLA em cervídeos é pouco estudada no Brasil, vem sendo descrita em alguns países da Europa, principalmente Espanha (RUIZ-FONS et al., 2008; GARCÍA et al., 2009; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2010; FALCONI et al., 2012), e Itália (FALCONI; PEZ-OLVER; GORTA'ZAR, 2011). Na América do Norte foi descrita nos EUA (JOHNSON et al., 2006). Na América do Sul, os poucos trabalhos epidemiológicos sobre a ocorrência do VLA em cervídeos são baseados no diagnóstico sorológico. Em veados campeiros do

Pantanal Argentino, Uhart et al. (2003) analisaram amostras sorológicas de 14 animais e não encontraram sorologia positiva. No Pantanal Boliviano, Deem et al. (2004) estudaram 15 veados catingueiros (*Mazama gouazoubira*), sem resultados positivos. No Brasil, Pandolfi et al. (1998) conseguiram detectar 88% (71/81) de soropositividade em cervos do pantanal (*Blastocerus dychotomus*) capturados na região da divisa entre São Paulo e Mato Grosso do Sul, quando ocorreu a construção de uma represa hidrelétrica e estes animais tiveram que ser relocados. Tomich et al. (2009) relataram a ocorrência de 100% (49/49) de veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) soropositivos para VLA pelo IDGA, no Município de Nhecolândia, sub-região do Pantanal de Mato Grosso do Sul.

Castilho – SP

No Município de Castilho, localizado na mesorregião de Araçatuba, foi identificado e caracterizado o VLA sorotipo 22 em um cervídeo da espécie *Blastocerus dichotomus*. As amostras foram encaminhadas em abril de 2013 para confirmação de diagnóstico de LA, pois o animal apresentava sinais clínicos da doença.

O cervídeo pertencia ao Parque Estadual do Aguapeí, que foi criado em 1998 como forma de compensação pela construção da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta. O Parque abrange área dos Municípios de Castilho, Nova Independência, Graraçaí, São João do Pau d'Alho, Monte Castelo e Junqueirópolis, sendo possível em alguns desses municípios, presenciar áreas mistas, onde há áreas de criação animal próximas a áreas de floresta do Parque. O Parque abrange grandes extensões de várzeas do rio Aguapeí, que são alagadas periodicamente (IBGE, 2016), sendo considerado um dos últimos locais onde ainda é encontrado o Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) no Estado de São Paulo, considerado uma espécie criticamente em perigo de extinção.

Este é o primeiro relato do VLA sorotipo 22 na espécie *Blastocerus dichotomus* no Estado de São Paulo.

Todos estes resultados e informações epidemiológicas reforçam a importância da realização de outros estudos sobre as doenças hemorrágicas que acometem os ruminantes selvagens, além de contribuir com a vigilância sanitária em áreas de floresta, onde há áreas mistas, com circulação de animais silvestres, principalmente cervídeos suscetíveis ao VLA, que podem ser infectados devido à proximidade com áreas de criação de ruminantes domésticos.

A distribuição dos sorotipos do VLA no Estado de São Paulo foi georreferenciada conforme os resultados do sequenciamento, da localização geográfica das propriedades, associando o sorotipo do VLA identificado e a espécie afetada (Figura 36).

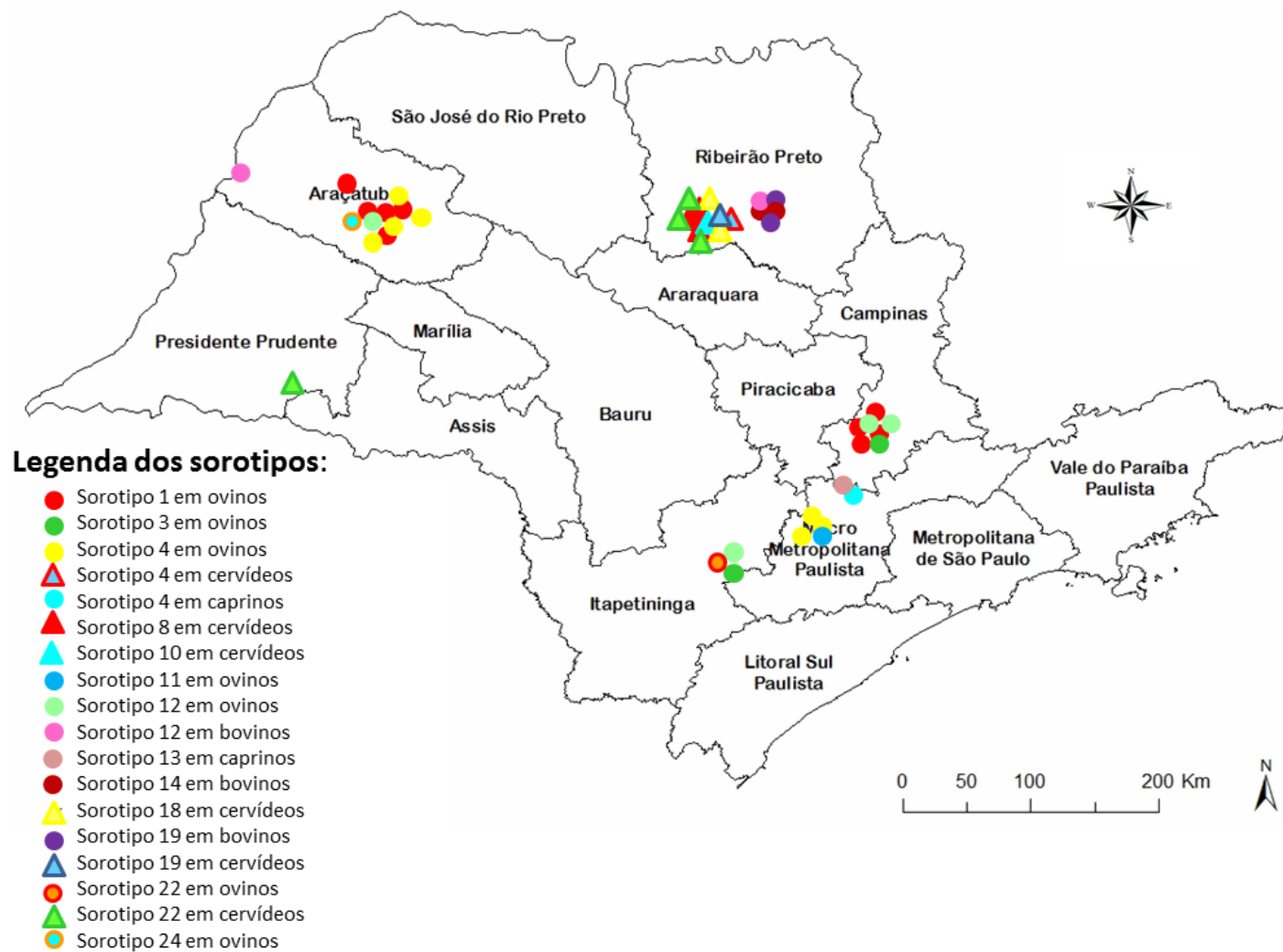


Figura 34 - Distribuição dos sorotipos do VLA, conforme o sorotipo sequenciado e a espécie animal afetada, e a localização geográfica das propriedades nas mesorregiões do Estado de São Paulo.

Região do Vale do Paraíba Fluminense-RJ

No Estado do Rio de Janeiro, foi possível a detecção e caracterização do VLA sorotipos 1, 4, 10, 12 e 18 em ovinos e bovinos com características leiteiras, a partir de amostras de sangue e tecidos, coletadas em diferentes períodos dos anos de 2013, 2014 e 2015. O primeiro diagnóstico confirmatório de LA foi feito em fevereiro/março de 2013, após o recebimento de amostras clínicas.

Acredita-se que os casos esporádicos de manifestação clínica por BTV ocorrem em consequência à combinação de diversos fatores epidemiológicos, como a introdução de ovinos de raça europeia com objetivo de melhoramento zootécnico do rebanho, sem a devida adaptação à região, endemicidade da doença na região causada por vários sorotipos de língua azul, onde foram introduzidos os animais livres. Além das condições ambientais favoráveis para a disseminação do VLA. Além disso, a região possui características propícias à proliferação de vetores competentes do VLA. Surtos da doença ocorrem tipicamente quando ovinos suscetíveis são introduzidos em área endêmica ou quando mosquitos carregam o vírus de uma região endêmica para áreas adjacentes contendo populações de ovinos suscetíveis (EMBRAPA, 2006).

Estudos realizados constataram a alta susceptibilidade de praticamente todas as raças ovinas à infecção pelo VLA, com algumas variações quanto à intensidade da doença, e aparecimento dos sinais clínicos, sendo estes mais frequentemente observados em raças exóticas quando introduzidas em regiões tropicais ou em rebanhos nativos localizados próximos a áreas consideradas endêmicas (LAENDER, 2002). No Brasil, os raros focos com graves manifestações clínicas da doença em ovinos foram nas raças de ovinos Lacaune, Texel, Hampshire Down, Corriedale e Santa Inês (ANTONIASSI et al., 2010; BALARO et al., 2014; LIMA 2013).

6.4 Análise Climática

Os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro estão localizados na região endêmica para a ocorrência do VLA, pois possuem características climáticas como altas temperaturas e elevada precipitação, associadas à presença de ruminantes, propiciando o desenvolvimento de vetores competentes e a proliferação do VLA. Os municípios do estado de São Paulo analisados apresentaram temperatura média variando de 21,3 a 29,1°C e média de precipitação 93,2 a 143,3 mm, e no Rio de Janeiro a região afetada apresentou temperatura

média variando de 33,4 a 13°C e média de precipitação de 7 a 135,2 mm, fatores estes que favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores, e facilitando a endemicidade da doença (LOBATO, 1996; LOBATO et al., 2015). Em todos os municípios pode-se constatar que as chuvas se concentram principalmente nos meses de verão (dezembro, janeiro e fevereiro) e nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro ocorreram também às médias mais elevadas de temperaturas, sendo que temperatura e umidade são variáveis que influenciam diretamente na dinâmica populacional do vetor (CHAGAS; PINHEIRO, 2004), pois faz com que ocorra a diminuição do tempo de eclosão dos ovos e de desenvolvimento das larvas (WITTMANN; BAYLIS, 2000). Portanto, esses fatores ambientais são fundamentais para o processo de transmissão viral, pois o aumento da população do vetor resulta no aumento da atividade (voo e repasto sanguíneo) dos insetos (WARD, 1994; MELLOR, 1996).

O Brasil encontra-se inserido em uma área endêmica para a ocorrência do VLA, apresentando condições de temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento de vetores competentes, e inúmeras evidências sorológicas que indicam que o vírus está presente na região (LOBATO; GUEDES; MATOS, 2015).

Destacando-se a importância e a necessidade de estudos entomológicos com levantamento epidemiológico da fauna de *Culicoides* destas regiões, associado ao isolamento e tipificação viral, de modo a mitigar as lacunas existentes no ciclo epidemiológico da LA no Brasil. Proporcionando avanços científicos no comportamento e distribuição dos vetores competentes. Além disso, estudos climáticos e ambientais são fundamentais para identificar áreas de risco e realizar medidas de controle dos insetos vetores e da doença.

7. CONCLUSÕES

Amostras positivas de VLA da coleção viral do LVB/IB foram isoladas com sucesso, em OEG e adaptadas em células BHK-21 (recuperado o vírus em 75%), possibilitando realização dos estudos sobre a epidemiologia molecular do VLA, cujo conhecimento é escasso. O isolamento facilitou o sequenciamento completo do VLA por meio NGS.

Obteve-se a sequência completa do genoma em 27 amostras, identificando 09 (nove) sorotipos (BTV-1, BTV-3 BTV-4, BTV-8, BTV-10, BTV-12, BTV-14, BTV-18 e o BTV-22). O sequenciamento dos 10 segmentos do VLA por meio de NGS forneceu importantes informações epidemiológicas sobre a disseminação desta doença no Brasil. Evidenciando as diferenças genéticas dos isolados brasileiros de VLA em relação às de referência depositadas no “GenBank”, essa variabilidade sugere novos topotipos aos isolados brasileiros.

Em 54 amostras de bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos, colhidas a partir 2007, que foram sequenciadas parcialmente, com base no segmento 2 identificou-se:

- pela primeira vez no Brasil os sorotipos BTV-1, BTV-9, BTV-11 e BTV-24 (ovinos), BTV8 (cervídeos), BTV10 (ovino e cervídeos), BTV-13 (caprino);
- endêmicos sorotipos BTV-3 (ovino), BTV-4 (bovino, ovino, caprino e cervídeo), BTV-12 Bovina e ovina), BTV-14 (bovino), BTV-18 (ovino e cervideo), BTV-19 (bovino e cervideo) e BTV-22 (vino e cervideo).

Constatou-se variabilidade conforme a origem do isolado de BTV no Brasil e espécie animal. Os sorotipos mais frequentes foram BTV-1, BTV-4 e do BTV-12 na região estudada.

As condições climáticas no período em que foram obtidas as amostras dos animais positivos para o VLA foram favoráveis ao desenvolvimento do vetor.

Gerou-se importantes informações epidemiológicas que auxiliarão na tomada de decisões para a condução dos programas sanitários brasileiros, na produção de reagentes (primers, sondas, dentre outros) e no desenvolvimento de novos métodos de análise e produção de vacinas.

REFERÊNCIAS

ABREU, U.G.P.; SERENO, J.R.B. **Avaliação de matrizes bovinas no Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 2005, 4p. Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 52.

ABREU, V.L.V. **Prevalência de Bovinos Reagentes à Prova de Imunodifusão para Língua Azul na Região Norte do Brasil**. 1982. Dissertação- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, Oxfordshire, v.60, n.2, p.93-109, 1990.

AFSHAR, A.; THOMAS, F.C.; WRIGHT, P.F.; SHAPIRO, J.L.; ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting blue-tongue virus antibodies in cattle and sheep. **Veterinary Research**, London, v.124, p.136-141, 1989.

AGREN, E. C. C.; BURGIN, L.; STERNBERG LEWERIN, S.; GLOSTER, J.; ELVANDER, M. Possible means of introduction of bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) to Sweden in August 2008: comparison to results from two models for atmospheric transport of Culicoides vector. **Veterinary Record**, London, v. 167, p. 484–488, 2010.

AGÜERO, M.; ARIAS, M.; ROMERO, L.J.; ZAMORA, M.J.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.337-341, 2002.

AKITA, G. Y.; IANCONESCU, M.; MACLACHLAN, N. J.; OSBURN, B. I.; GREENE, R. T. Bluetongue disease in dogs associated with contaminated vaccine. **Veterinary Record**, vol.134, n.11, p.283, 1994.

ALCARDE, A. C.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVER, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Alemanha, v.22, n. 6, p. 711–728, 2013.

ALEXANDER, K. A.; MACLACHLAN, N. J.; KAT, P. W.; HOUSE, C.; O'BRIEN, S. J.; LERCHE, N. W.; SAWYER, M.; FRANK, L. G.; HOLEKAMP, K.; SMALE, L.; WELDON, J. W.; LAURENSEN, M. K.; MILLS, M. G. L.; OSBURN, B. I. Evidence of Natural Bluetongue Virus Infection among African Carnivores. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, n°5, p.568-576, 1994.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora da UFSM, 2007, p.793-807.

ALLANDER, T.; TAMMIS, M. T.; ERIKSSON, M.; BJERKNER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; ANDERSSON, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. 2005. **PNAS**. Disponível em <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504666102>>. Acesso em: 12 Jun. 2015.

ALLISON, A. B.; GOEKJIAN, V. H.; POTGIETER, A. C.; WILSON, W. C.; JOHNSON, D. J.; MERTENS, P. P. C.; STALLKNECHT, D.E. Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in the USA containing RNA segments derived from both exotic (EHDV-6) and endemic (EHDV-2) serotypes. **The Journal of general virology**, v.430, e 9, London, 2009.

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

ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>>. Acesso em: 01 mai. 2017.

ANBA - Agência de Notícias Brasil-Árabe. Brasil quer virar exportador de ovinos e caprinos. Geovana Pagel, 2010. Disponível em: <http://www.anba.com.br/noticia_agronegocios.kmf?Cod=10372758>. Acesso em: 21 mai. 2015.

ANTONIASSI, N.A.B. **Aspectos clínicos e patológicos da infecção pelo vírus da língua azul em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul**. 2010. Dissertação de mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ANTONIASSI, N.A.B.; PAVARINI, S. P.; RIBEIRO, L. A. O.; SILVA, M. S.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 1010-1016, 2010.

APARÍCIO A. A. S.; CASTELLÓN, G. E.; FONSECA, R. F. O. Distribuição de *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) na Amazônia Legal através de técnicas de geoprocessamento. **Revista Colombiana Ciencia Animal**, v.3, n.2, p.283-299, 2011.

ARADAIB I.E.; SCHORE C.E.; CULLOR J.S.; OSBURN B.I. A nested PCR for detection of North American isolates of bluetongue virus based on NS1 genome sequence analysis of BTV-17. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p.99-108, 1998.

ARADAIB, I.E.; MOHAMED, M.E.H.; ABDALLA, T.M.; SARR, J.; ABDALLA, M.A.; YOUSOF, M.A.M.; HASSAN, Y.A.; KARRAR, A.R.E. Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.145-150, 2005.

ARITA, G.M.M.; MORATO, R.G.; DUARTE, J.M.B. Língua azul e/ou doença epizootica hemorrágica. In: DUARTE, J.M.B. (Ed.). *Biologia e Conservação dos Cervídeos Sul Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Jaboticabal: FUNEP, 1997.

ATTOUI, H.; MOHD JAAFAR, F.; BELHOUCHE, M.; ALDROVANDI, N.; TAO, S.; CHE, B.; LIANG, G.; TESH, R.B.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X.. Yunnan orbivirus, a new orbivirus species isolated from *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in China. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p 3409 – 3417, 2005.

ATTOUI, H.; MENDEZ-LOPEZ, M.R.; RAO, S.; HURTADO-ALENDES, A.; LIZARASO-CAPARO, F.; JAAFAR, F. M.; SAMUEL, A. R.; BELHOUCHE, M.; PRITCHARD, L. I.;

MELVILLE, L.; WEIR, R. P.; HYATT, A. D.; DAVIS, S. S.; LUNT, R.; CALISHER, C. H.; TESH, R. B.; FUJITA, R.; MERTENS, P. P.C. Peruvian horse sickness virus and Yunnan orbivirus, isolated from vertebrates and mosquitoes in Peru and Australia. **Virology**, v.394, n°2, p.298–310, 2009.

ATTOUI, H.; MENDEZ-LOPEZ, M.R.; RAO, S. et al. *Reoviridae*. In: King A, Adams M., Carstens E., Lefkowitz E., editor. *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier Academic Press, London,UK 2012.

BABU, N.G.R. Isolation and preliminary characterization of bluetongue virus from sheep. **Indian Veterinary Journal**, v.69, n.12, p.1071-1074, 1992.

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

BARBER, T. L. Temporal appearance and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, London, v.29, n.7, p.1654-1656, 1979.

BARRATT-BOYES S.M.; MACLACHLAN N.J. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves, **Veterinary Microbiology**, v.40, p.361-371, 1994.

BARRATT-BOYES, S. M.; ROSSITTO, P.V.; TAYLOR, B.C.; ELLIS, J.A.;MACLACHLAN, N.J. Response to the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.45, n.1, p.73-84, 1995.

BARROS, V.L.L.; MARINHO, R.M.; REBELO, J.M.M.Ocorrência de espécies de *Culicoides* latreille (Diptera, Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.11, p.2789-2790, Maranhão, 2007.

BATTEN, C.A; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; BIN-TARIF, A.; KGOSANA, L.; SWAIN, A.J.; CORTEYN, M.; DARPEL, K.; MELLOR, P.S.; ELLIOTT, H.G.; OURA,

C.A.L. Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RTPCR detection methods. **Veterinary Microbiology**, v.129, n.1-2, p.80–88, 2008.

BATTEN, C.; DARPEL, K.; HENSTOCK, M.; FAY, P.; VERONESI, E.; GUBBINS, S.(2014) Evidence for Transmission of Bluetongue Virus Serotype 26 through Direct Contact. **PLoS ONE**, v. 9, n.5, p. e.96049, 2014.

BAYLIS, M. The re-emergence of bluetongue. **Veterinary Journal**, v.164, n.5-6, p.5-6, 2002.

BELAGANAHALLI MN, MAAN S, MAAN NS, NOMIKOU K, PRITCHARD I, et al. Full Genome Sequencing and Genetic Characterization of Eubenberg Viruses Identify Pata Virus as a Distinct Species within the Genus *Orbivirus*. **PLoS ONE**, v. 7, n.3, p. e 31911, 2012 .

BELBIS, G. et al. Evidence of transplacental transmission of bluetongue virus serotype 8 in goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.166, n.3-4, p. 394-404, 2013.

BELHOUCHE, M. et al. Detection of a fourth *orbivirus* non-structural protein. **PloS One**, v. 6, n.10 p. 256-297, 2011.

BERNARDES, N.T.C.G. **Soroprevalência da língua azul em bovinos do Estado de São Paulo, Brasil, 2001**. 59f. 2011. 59f. Dissertação (Mestrado), Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

BHANUPRAKASH, V.; INDRANI, B.K.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; SINGH, R.K. Bluetongue vaccines: the past, present and future. **Expert Reviews Vaccines**, v. 8, p.191– 204, 2009.

BHATTACHARYA, B.; ROY, P. Role of Lipids on Entry and Exit of Bluetongue Virus, a Complex Non-Enveloped Virus. **Viruses**, v.2,n.5, p.1218-1235, 2010.

BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 25-30, 2003.

BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; SPYROU, V.; NOMIKOU, K.; MANGANA, O.; PANAGIOTIDIS, C.A.; PAPADOPOULOS, O. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription – PCR: a comparison with conventional methods. **Journal Virology Methods**, v.98, p.77-89, 2001.

BONNEAU, K.R.; DEMAULA, C.D.; MULLENS, B.A.; MACLACHLAN, N.J. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep, **Veterinary Microbiology**, v.88, p.115-125, 2002.

BORKENT A. **World species of biting midges** (Diptera: Ceratopogonidae) [Internet] 2009. Salmon Arm, Canada in association with the Royal British Columbia Museum, American Museum of Natural History, and Instituto Nacional de Biodiversidad [cited 2012 Dec 8]. Disponível em: < [http: www.inhs.illinois.edu/research/FLYTREE/CeratopognidaeCatalog.pdf](http://www.inhs.illinois.edu/research/FLYTREE/CeratopognidaeCatalog.pdf).> Acesso em 18 set. 2016.

BORKENT, A.; WIRTH, W.W. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). **Bulletin of the American Museum of Nature History**, p. 233-257, British Columbia, 1997.

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**, London, v.44, n.12, p.2268-2270, 1983.

BOWEN, R.A.; HOWARD, T.H.; PICKETT, B.W. Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls. **Progress in clinical and biological research**, v.178, p.91-96, New York, 1985.

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

BREARD, E.; HAMBLIN, C.; HAMMOUMI, S.; SAILLEAU, C.; DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. **Research in Veterinary Science**, v.77, n.1, p.1-8, 2004.

BREWER, A.W.; MACLACHLAN, N.J. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. **Archives of Virology**, v.136, p.287-298, 1994.

BRODIE, S.J.; WILSON, W.C.; O'HEARN, P.M.; MUTHUI, D.; DIEM, K.; PEARSON, L.D. The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription *in situ* PCR. **Journal of Virology**, London, v.72, p.5599-5609, 1998.

CALVETE, C.; ESTRADA, R.; MIRANDA, M.A.; DEL RIO, R.; BORRÁS, D.; BELDRON, F.J.; MARTÍNEZ, A.; CALVO, A.J.; LUCIENTES, J. Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n.2, p. 169–175, 2010.

CAMACHO C.; COULOURIS G.; AVAGYAN V.; MA N.; PAPADOPOULOS J.; BEALER K.; MADDEN T.L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v.10 p.421, 2008.

CANNON, R.M.; ROE, R.T. **Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians**. Canberra: Australian Bureau of Animal Health, 1982. p.14-17.

CARPENTER, S.; WILSON, A.; MELLOR, P.S. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. **Trends in Microbiology**, v. 17, p.172–178, 2009.

CARPI, G.; HOLMES, E. C.; KITCHEN A. The evolutionary dynamics of bluetongue virus. **Journal of Molecular Evolution**, Zuckerkandl, v.70, p. 583–592, 2010.

CARVALHO, M. C. DA C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, mar, 2010.

CARVALHO, L.F.R.; DE MELO, C.B.; DRUMMOND V.O. Procedimentos para exportação e importação de material genético pelo Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.415-422, 2007.

CASTELLÓN, E. G. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) na Amazônia Brasileira. II. Espécies coletadas na Reserva Florestal Ducke: aspectos ecológicos e distribuição geográfica. **Acta Amazonica**. Manaus, v.20, p.83-93, 1990.

CASTELLÓN, E. G.; FERREIRA, R. L. M.; SILVA, M. N. T. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) na Amazônia Brasileira. I. Coletas na usina hidrelétrica (UHE) de Balbina, usina hidrelétrica (UHE) Cachoeira Porteira e Cachoeira dos Espelhos (Rio Xingu). **Acta Amazonica**. Manaus, v.20, p.77-81, 1990.

CASTELLÓN, E. G.; FERREIRA, R. L. M. *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) da Amazônia. III. Resultados de coletas noturnas, na Reserva Florestal Ducke, Estado do Amazonas, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Belém, v.7, p.117-123, 1991.

CASTELLÓN, E.G.; FERREIRA, R. L. M.; SILVA, M. N. T. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Brazilian Amazon. IV. Species collected with CDC light trap in the Ducke Forest Reserve (DFR), Amazon State, Brazil. **Acta Amazonica**. Manaus, v.23 n.2-3, p.309-310, 1993.

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

CHAGAS, A. C. S.; PINHEIRO, R.R. Língua azul: conhecer para prevenir. Embrapa Caprinos, 34 p., 2004. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/caprinos-eovinos/busca-de-](https://www.embrapa.br/caprinos-eovinos/busca-de)

publicacoes/-/publicacao/531308/lingua-azul-conhecer-paraprevenir>. Acesso em: 15 Jun.2015.

CEBRA, C.; CEBRA, M. Enfermidades dos sistemas hematológico, imunológico e linfático (doenças multissistêmicas). In: D.G.PUGH (Ed). **Clínica de Ovinos e Caprinos**, São Paulo: Roca, 2004. p.430.

CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; SCHERRER, N.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; BATTEN, C.; CORTYEN, M.; HOFMANN, M.; THUER, B. Toggenburg *Orbivirus*, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v.138, p.11-19, 2009.

CIIAGRO – **Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/>>. Acesso em: mai. 2017.

CLAVIJO, A.; HECKERT, R.A.; DULAC, G.C.; AFSHAR, A. Isolation and Detection of Bluetongue Virus. **Journal of Virological Methods**, v.87, p.3-23, 2000.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.;LOPEZ, J.W. Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America. **The Veterinary Record**, v.151, p.301-302, 2002.

CLAVIJO, A.; SUN, F.; LESTER, T.; JASPERSON, D.C.; WILSON, W.C. An improved Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Simultaneous Detection of All Serotypes of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.22, n.4, p.588-593, 2010.

COSTA, J.R.R. **Produção e Padronização de Antígeno para Língua Azul e Prevalência nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul**. 2000. Dissertação- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMENN, G.P.; LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e

sudeste do Rio grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.273-275, 2006.

COSTA, P. C. C.; POOLY R. A Viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. **Journal of Virology**, London,v.83, n.13, p. 6806-6816, 2013

CAPOBIANCO DONDONA, A.; LAPAOLO, F; MONACO, F.; ASHENBORN, O.; SPEDICATO, M.; CARMINE, I.; SCACCHIA, C.; SAVINI, G. Bluetongue in springboks and wildebeests in the Etosha National Park (Namibia): circulating strains and epidemiology. In: 7th **Annual Meeting Epizone: Nothing permanent, except change**, 01-04 October 2013, Brussels, Belgium. p.114, 2013.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D.M.; TEIXEIRA, A.C. Anticorpos Precipitantes para o Vírus da Língua Azul em Soros de Bovinos do Estado do Rio de Janeiro. **Biológico**, v.48, p.99-103, 1982.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D.M.; PASSOS, W.S. Anticorpos para o vírus da língua azul em soros de bovinos do Estado de São Paulo e da região Sul do País. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.9, n.5, p.121-124, 1987.

CUNHA, R.G.; SOUZA, D.M.; TEIXEIRA, A.C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**, v.3, supl.n 2, p.53-56, 1988.

CUNHA, R.G. Anticorpos neutralizantes em soros de ruminantes domésticos do Brasil frente aos diferentes sorotipos do vírus da língua azul. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.12, n.8, p.3-7, 1990.

DANIELS, P.W.; SENDOW, I.; SOLEHA, E.; SUKARSI, H.; HUNT, N.T.; BAHRI, S. Australian-Indonesian collaboration in veterinary arbovirology: a review. **Veterinary Microbiology**, v.46, p.151-526, 1995.

DARPEL, K.E.;BATTEN, C.A.; VERONESI, E.; SHAW, A.E.; ANTHONY, S.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; KGOSANA, L.; BIN-TARIF, A.; CARPENTER,

S.; MÜLLER-DOBLIES, U.U.; TAKAMATSU H.H.; MELLOR, P.S.; MERTENS, P.P.; OURA, C.A. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. **The Veterinary Record**, v. 161, n. 8, p. 253–261, 2007.

DARPEL, K. E.; BATTEN, E. C. A.; VERONESI, S. W.; ANDERSON, P.; DENNISON, M.; CLIFFORD S.; SMITH, C.; PHILIPS, L.; BIDEWELL, C.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; SANDERS, A.; BIN-TARIF, A.; WILSON A. J.; GUBBINS, S.; MERTENS, P. P.C.; OURA, C. A.; MELLOR, P.S. Transplacental Transmission of Bluetongue Virus 8 in Cattle, UK. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.12, p.2025-2028, 2009.

DEEM, S.L.; NOSS, A.J.; VILLARROEL, R.; Uhart, M.M.; Karesh, W.B. Disease survey of free-ranging grey rocket deer (*Manzama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal Wildlife Diseases**, v.40, p.92-98, 2004.

DEMAULA, C.D.; HEIDNER, H.W.; ROSSITTO, P.V.; PIERCE, C.M.; MACLACHLAN, N.J. Neutralization determinants of United States bluetongue virus serotype 10. **Virology**, v.195 n.1, p.292-296, 1993.

DESMECHT, D.; BERGH, R.V.; SARTELET, A.; LECLERC, M.; MIGNOT, C.; MISSE, F.; SUDRAUD, C.; BERTHEMIN, S.; JOLLY, S.; MOUSSET, B.; LINDEN, A.; COIGNOUL, F.; CASSART, D. Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. **Veterinary Record**, v.163, n.2 p. 50–52, 2008.

DJIKENG, A.; HALPIN, R.; KUZMICKAS, R.; DEPASSE, J.; FELDBLYUM, J.; SENGAMALAY, N.; AFONSO, C.; ZHANG, X.; ANDERSON, N. G.; GHEDIN, E.; SPIRO, D. J. Viral genome sequencing by random priming methods. 2008. **BMC Genomics**, v.9. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/5>>. Acesso em: 13 Ago. 2015.

DORNELES, E.M.S.; MORCATTI, F.C.; GUIMARÃES, A.S.; LOBATO, Z.I.P.; LAGE, A.P.; GONÇALVES, V.S.P.; GOUVEIA, A.M.G.; HEINEMANN, M.B. Prevalence of

bluetongue virus antibodies in sheep from Distrito Federal, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.4, p.1521-1524, 2012.

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

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

DUBOVI, E.J.; HAWKINS, M.; GRIFFIN, R.A. JR; JOHNSON, D.J.; OSTLUND, E.N. Isolation of Bluetongue virus from canine abortions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, n.4, p.490-49, 2013.

DUNGU, B.; GERDES, T.; SMIT, T. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. **Veterinary Italian**, v.40, n3, p.616-622, 2004.

ELBERS, A.R.W.; BACKX, A.; MINTIENS, K.; GERBIER, G.; STAUBACH, C.; HENRICKX, G.; VAN DER SPEK, A. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v.87, n.1-2, p.31-40, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Epidemiologia do Vírus da Língua Azul em Rebanhos Bovinos. **Documento 85**, Corumbá, MS. 2006. p.1-23.

ESCHBAUMER, M.; HOFFMANN, B.; MOSS, A.; SAVINI, G.; LEONE, A.; KÖNIG P.; ZEMKE, J.; CONRATHS, F.; BEER, M. Emergence of bluetongue virus serotype 6 in

Europe-German field data and experimental infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n.2, p. 189–195, 2010.

EVERMANN, J.F.; MCKIERNAN, A.J.; WILBUR, L.A.; LEVINGS, R.L.; TRUEBLOOD, E.S.; BALDWIN, T.J.; HUGHBANKS, F.G. Canine fatalities associated with use of a modified live vaccine administered during late stages of pregnancy. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, n 2, p.353–357, 1994.

FALCONI, C.; PEZ-OLVERA, J. R. L.; BOADELLA, M.; CAMARENA, J.; ROSELL, R.; ALCAIDE, V.; VICENTE, J.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; PUJOLS, J.; GORTA´ZAR, C. Evidence for BTV-4 circulation in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in Cabañeros National Park, Spain. **Veterinary Microbiology**, v.159, n.4, p.40–46, 2012.

FALCONI, C.; PEZ-OLVERA, J.R.L.; GORTA´ZAR, C. BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: A review. **Veterinary Microbiology**, v.151, n.3, p.209-219, 2011.

FELIPPE-BAUER, M. L.; DAMASCENO, C.P.; PY-DANIEL, V.; SPINELLI, G. R. *Culicoides baniwa* sp. nov. from the Brazilian Amazon Region with a synopsis of the hylas species group (Diptera: Ceratopogonidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, ed.6, p.851-857, 2009.

FELIPPE-BAUER, M.L.; CÁCERES, A.; SILVA, C.S.; VALDERRAMA-BAZAN, W.; ANTERO GONZALES-PEREZ, A.; COSTA, J.M. New records of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. **Biota Neotropica**, v.8, n.2, p.33-38, 2008.

FELIPPE-BAUE, M. L.; OLIVEIRA, S. J. Lista dos exemplares tipos de Ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) depositados na coleção entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.8, p.1109-1111, 2001.

FELIPPE-BAUER, M.L.; VERAS, R.; CASTELLÓN, E.G.; MOREIRA, N.A. A new *Culicoides* from the Amazonian region, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.1, p.35-37, 2000.

FERRAGINA, P.; MANZINI, G. An experimental study of an opportunistic index. Society for Industrial and Applied Mathematics. **ACM – Digital Library**, Washington, v.1, p. 269-278, 2001.

FLANAGAN, M.; JOHNSON, S. The effects of vaccination of Merino ewes with an attenuated Australian bluetongue virus serotype 23 at different stages of gestation. **Australian Veterinary Journal**, v.72, n.2; p.455–457,1995.

FUKUSHO, A.; RITTER, GD.; ROY, P. Variation in the bluetongue virus neutralization protein VP2. **The Journal of general virology**, v.68, p. 2967-2973, London, 1987.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B; REGO JR., F.A.; OSHIRO, E.T.; CHANG. M.R. Estudo de Flebotomíneos (Díptera: *Psychodidae*) em Foco de Leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.4, p.378-390, 1997.

GARCÍA, I.; NAPP, S.; CASAL, J.; PEREA, A.; ALLEPUZ, A.; ALBA, A.; CARBONERO, A.; ARENAS, A.; Bluetongue epidemiology in wild ruminants from Southern Spain. **European Journal Wildlife Research**, v.55, p.173-178, 2009.

GASPARINI, M. R. **Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de sêmen bovino para Bovine viral diarrhoea virus e Bluetongue virus utilizando RT-PCR convencional e em tempo real (qRT-PCR)**. 125p. 2014. Tese Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais

GASPARINI, M.R.; NOMIKOU, K.; MORECROFT, E.; LEITE, R.; GUEDES, M.; LOBATO, Z.I. P.; BARBOSA-STANCIOLI, E.; MERTENS, P.P.C. Bluetongue virus: identification of BTV-4, BTV-8, BTV-10 and BTV-16 in semen from asymptomatic bulls from Brazil. In: IV Conferenza Internazionale sulla Bluetongue, 2014, Roma. **Proceedings...** Roma: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, 2014.

GIBBS, E.P.J.; GREINER, E.C.; TAYLOR, W.P.; BARBER, T.L.; HOUSE, H.A.; PEARSON, J.E. Isolation of bluetongue virus serotype 2 from cattle in Florida. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.4, p.2226-2228, 1983.

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

GOLDSMITH, L.; BARZILAI, E. An improved method for the isolation and identification of bluetongue virus by intravenous inoculation of embryonating chicken eggs. **Journal of Comparative Pathology**, v.78, n.4, p.477-487, 1968.

GONZÁLEZ, M.C.; PÉREZ, N.; SIGER, J. Evidencia sexológica a virus de lengua azul en bovinos del estado Aragua, Venezuela. **Revista Facultad de Ciencias Veterinarias-UCV**, v.41, n.13, p.3-12, 2000.

GORSCH, C.; VAGNOZZI, A.; DUFFY, S.; MIQUET, J.; PACHECO, J.; BOLONDI, A.; DRAGHI, G.; CETRA, B.; SONI, C.; RONDEROS, M.; RUSSO, S.; RAMIREZ, V.; LAGER, I. Bluetongue: isolation and characterization of the virus and vector identification in the northeast of Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.34, n.2, p.150-156, 2002.

GORCHS, C.; LAGER, I. Actualización sobre el agente y la enfermedad. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.33, p.122-132, 2001.

GREINER, E.C.; BARBER, T.L.; PEARSON, J.E.; KRAMER, W.L.; GIBBS, E.P.J. Orbiviruses from Culicoides in Florida. In: BARBER, L.; JOCHIM, M.M. (Eds.) **Bluetongue and Related Orbiviruses**. New York: A.R. Liss, 1985. p.195-200.

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.3/4, p.160-164, 1982.

GUMM I.D.; TAYLOR, W.P.; ROACH, C.J.; ALEXANDER, F.C.; GREINER, E.C.; GIBBS, E.P. Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. **Veterinary Records**, v. 114, n.26, p. 635-638, 1984.

HENDRICKX, G.; CONTRERAS, V.; URIEN, C.; BONNEAU, M.; TAKAMATSU, H.H.; MERTENS, P.P.; BRÉARD, E.; SAILLEAU, C.; ZIENTARA, S.; SCHWARTZZ-CORNIL, I. The spread of bluetongue in Europe. **Small Ruminant Research**, v.86, n.17, p.34–39, 2009.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY)**, v.1, n.9, p.1026-1030, 1993.

HOCH, A.L.; ROBERTS, D.R.; PINHEIRO, F.P. Host-seeking behavior and seasonal abundance of *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.6, p.110-114, 1990.

HOFMANN, M.A.; RENZULLO, S.; MADER, M.; CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; THUER, B. Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, p.1855-1861, 2008. Disponível em : <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/12/08-0818.htm>>. Acesso em: 13 Mar. 2015.

HOMAN, E.J.; LORBACHER DE RUIZ, H.; DONATO, A.P.; TAYLOR, W.P.; YUILL, T.M. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Costa Rica and Northern Colombia. **Journal of Hygiene**, v.4, n.12, p.357-363, 1985.

HORODESKY, A. Sequenciamento de Nova Geração para análises metagenômicas: enfoque ao uso do sequenciador Illumina. Disponível em: <<http://www.gia.org.br/m%C3%ADdia-e-pr%C3%A2mios/videos/problemas-na-ostreicultura/19-not%C3%ADcias/264-sequenciamento-de-nova-geracao>>Publicado em 19/11/2014. Acesso em Jun. 2016.

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

HOWERTH EW, TYLER DE. Experimentally induced bluetongue virus infection in white-tailed deer: ultrastructural findings. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p. 1914–1922, 1988.

HUBÁLEK, Z.; HALOUZKA, J. (1999). West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.643–650, 1999.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VIRUS TAXONOMY, (ICTV), 2016 Disponível em: <<https://ictvonline.org>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Área Territorial Oficial - Consulta por Unidade da Federação**. Disponível em : <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/areaterritorial/principal.shtm> > Acesso em: 18 de Set. de 2016.

Internation Union for Conservation of Nature - IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 19 jan. 2017.

JENCKEL, M.; BREARD, E.; SCHULZ, C.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; HOFFMANN, B.; HOPER, D.; BEER, M.; ZIENTARA, S. Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27. **Genome Announcements**, v.3, e.2, Washington, 2015.

JIMÉNEZ-CLAVERO, M.A.; AGUERO, M.; SAN MIGUEL, E.; MAYORAL, T.; LÓPEZ, M.C.; RUANO, M.J.; ROMERO, E.; MONACO, F.; POLCI, A.; SAVINI, G.; GÓMEZ-TEJEDOR, C. High throughput detection of bluetongue virus by a new real time fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction: application on clinical samples from current mediterranean outbreaks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.18, p.7-17, 2006.

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 Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.398-401, Columbia, 2006.

JOHNSON, D.J.; WILSON, W.C.; PAUL, P.S. Validation of a reverse transcriptase multiplex PCR test for the serotype determination of U.S. isolates of bluetongue virus. **Veterinary Microbiology**, v.76, n p.105-115, 2000.

JOHNSON, D.J.; OSTLUND, E.N.;KILLIAN, M.L.; FRANZEN, K. M. Bluetongue virus 1 isolate USA2010/FL 10-044273 segment 2, complete sequence. Submetido em 28 de abril de 2016

Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?Cmd=Link&LinkName=nuccore_nuccore_samespecies_rsgb&IdsFromResult=50253383 >. Acesso em: 10 de Mar. 2017

JOHNSON, D.J.; OSTLUND, E.N.;KILLIAN, M.L.; FRANZEN, K. M. Bluetongue virus 12 isolate USA2012/LA 12-046093 segment 2, complete sequence. Submetido em 28 de abril de 2016. Disponível em: <

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?Cmd=Link&LinkName=nuccore_nuccore_samespecies_rsgb&IdsFromResult=50253383 >. Acesso em: 10 de Mar. 2017

KAMPEN. H.; WERNER, D.; Three years of bluetongue disease in central Europe with special reference to Germany: what lessons can be learned? **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 122, n.3, p.31–39, 2010.

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

KAWANAMI, A.E. **Pesquisa de agentes virais de doenças hemorrágicas em cervídeos brasileiros: estudo retrospectivo**. 2012. 87f. Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2012.

KAWANAMI, A.E. **Vírus da língua azul em cervídeos neotropicais e bovídeos doméstico.** 2016. 99f. Tese – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.

KIDD, I.M.; CLARK, D.A.; EMERY, V.C. A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. **Journal of Virological Methods**, v.87, n.1-2, p.177-181, 2000.

KIRKLAND, P.D.; ZHANG, N.; HAWKES, R.A.; LI, Z.; ZHANG, F.; DAVIS, R.J.; SANDERS, D.A.; LI, H.; ZHANG, K.; BEN, J.; HE, G.F.; HORNITZKY, C.L.; HUNT, N.T. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China. **Epidemiology Investigation**, v.128, n.1, p.257-63, 2002.

KIRKLAND, P.D.; MELVILLE, L.F.; HUNT, N.T.; WILLIAMS C.F.; R.J. DAVIS. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adopted virus. **Veterinary Italian**, v.40, p.497-501, Teramo, 2004.

KIRSCHVINK, N.; RAES, M.; SAEGERMAN, C. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. **Veterinary Journal**, v.182, n.2, p.244–251, 2009.

KOMURIAN-PRADEL, F.; PARANHOS-BACCALÀ, G.; SODOYER, M.; CHEVALLIER, P.; MANDRAND, B.; LOTTEAU, V.; ANDRÉ P. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. **Journal of Virological Methods**, v.95, n.1-2, p.111-119, 2001.

KOEKEMOER, O.; DECASTRO, M.; MICHUKI, G. Genome sequences of bluetongue virus prototype strains. **Unpublished**, Onderstepoort, 2013.

KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de minas gerais e associações com problemas reprodutivos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.10, n.1, p.42-51, 2003.

KOUMBATI, M.; MANGANA, O.; NOMIKOU, K.; MELLOR, P.S.; PAPADOPOULOS, O. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.4, p.277-285, 1999.

KRAMER, W.L.; GREINER, E.C.; GIBBS, E.P.J. Seasonal variations in population size, fecundity and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. **Journal of Medical Entomology**, v.22, n.2, p.163-169, 1985.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.2-3, p.95-125, 2006.

LAENDER, J.O.; RIBEIRO, E.S.; GOUVEIA, A.M.G.; LOBATO, Z.I.P.; FELIPPE BAUER, M.L. Levantamento das espécies de *Culicoides latreille*, 1809 (diptera: ceratopogonidae) encontradas nas mesorregiões Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, Minas Gerais, Brasil. **Entomología y Vectores**, v.11, p.145-157, 2004.

LAENDER, J.O. **Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise de evidência clínica e sorológica e identificação de *Culicoides* sp.** 2002. 92f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

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

LANGMEAD, B.; STEVEN, L.S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v.9, n.4, p.357-359, 2012.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, L.S. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v.10, n.3, p.25, 2009.

LEBLANC, N., RASMUSSEN, T.B.; FERNÁNDEZ, J.; SAILLEAU, C.; RASMUSSEN, L.D.; UTTENTHAL, A.; ZIENTARA, S.; BELÁK, S.; HAKHVERDYAN, M. Development of a real-time TR-PCR assay based on oligonucleotide probe energy transfer for the detection of all serotypes of bluetongue virus. **Journal Virological Methods** v. 167, n.2, p. 165-171, 2010.

LEGISA D.; GONZALEZ, F.; DE STEFANO, G.; PEREDA, A.; DUS SANTOS, MJ. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. **Journal of General Virology**, v.94, n.3, p.652-662, 2013.

LEWERIN, S.S.; HALLGREN, G.; ELVANDER, M.; BERNDTSSON, L.T.; CHIRICO, J.; MIEZIEWSKA, K. Infection with bluetongue virus serotype 8 in Sweden in 2008. **Veterinary Record**, v. 167, n.5, p. 165–170, 2010.

LI, H. Exploring single-sample SNP and INDEL calling with whole-genome de novo assembly. **Bioinformatics**, v.28, n.14, p.1838–1844, 2012.

LI, H; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, v.26, n.5, p.589–595, 2010.

LI, H; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, 25(14):1754–1760, July 2009.

LI, R.; YU, C.; LI, Y.; LAM, T. W.; YIU, S. M.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J.; SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. **Bioinformatics**, v.25, n.15, p.1966–1967, 2009.

LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v.25, n.16, p.2078–2079, 2009.

LI, H.; RUAN, J.; DURBIN, R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. **Genome Research**, v.18, n.11, p.1851–1858, 2008.

LI, R.; KRISTIENSEN, K.; WANG, J. SOAP: short oligonucleotide alignment program. **Bioinformatics**, v.24, n.5, p.713–714, 2008.

LIMA, P.A.; UTIUMI, K.U.; YUMI, K.; NAKAGAKI, R.; BIIHRER, D.A.; ALBUQUERQUE, A.S.; REZENDE, F.S.; MATOS, D. C. A.; D, LOBATO, Z. I. P.; DRIEMEIER, D.; PECONICK, A. P.; VARASCHIN, M. S.; RAYMUNDO, D.L. Diagnoses of ovine infection by the serotype-4 bluetongue virus on Minas Gerais, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, n.2, p.1–5, 2016.

LIMA M.S.; MARTINS M.S.N.; MONTEIRO B.M.; BIRGEL JUNIOR E.H.; NOGUEIRA A.H.C.; STEFANO E.; PITUCO E.M. Comparison of methods for detection of antibodies to bluetongue in buffalo. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.17, 485-486p, 2012.

LIMA, M. S. **Caracterização do vírus da língua azul em ovinos, caprinos e cervídeos no Brasil**. 119f. 2013. Dissertação (Mestrado), Instituto Biológico, São Paulo.

LOBATO, Z.I.P. **Vírus de língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccinia e resposta imune**. 200f. 1996. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

LOBATO, Z.I.P.; BARCELOS, M.A.C.; LIMA, F. et al. Língua azul em ovinos e caprinos da região mineira da SUDENE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Buiatria, 2001. p.165.

LOBATO, Z.I.P; GUEDES, M.I.M.C.; MATOS, A.C.D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenge. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v.51, n.4, p.253-262, 2015.

LOPEZ, W.A., NICOLETTI, P., GIBBS E.P.J. Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. **Tropical Animal Health and Production**, v.17, n.2, p.1982. 1985.

LORUSSO, A.; PUGGIONI, G.; MARCACCI, M.; SPEDICATO, M.; CARMINE, I.; TEODORI, L.; LEONE, A.; CASACCIA, C.; PORTANTI, O.; ORSINI, M.; SAVINI, G. A novel bluetongue virus in healthy goats from Sardinia, Italy. In: 10th Annual Meeting Epizone: Going Viral, 27-29 September 2016, Madrid, Spain. **Anais**. p.70, 2016.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; SAMUEL, A. R.; O'HARA, R.; MEYER, A. J.; RAO, S.; MERTENS, P. P. Bluetongue virus 1 VP2 gene, isolate South Africa-ref, genomic RNA. **Journal Veterinaria Italiana**, Teramo, v.40, ed.4, p.489-496, 2004. (a)

MAAN, S.; MAAN, N.S.; SAMUEL, A.R.; RAO, S.; ATTOUI, H.; MERTENS P.P. Completion of the sequence analysis and comparisons of genome segment 2 (encoding outer capsid protein VP2) from representative isolates of the 24 bluetongue virus serotypes. **Journal Veterinaria Italiana**, Teramo, v.40, ed.4, p.484-488, 2004. (b)

MAAN, S.; MAAN, N.S.; SAMUEL, A.R.; RAO, S.; ATTOUI, H.; MERTENS P.P.C. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. **Journal of General Virology**, London, v.88, n2-3, p.621-630, 2007.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; ROSS-SMITH, N.; BATTEN, C.A.; SHAW, A.E.; ANTHONY, S.J. Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. **Virology**, v.377, p.308-318, 2008.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; NOMIKOU, K.; BATTEN, C.; ANTONY, F.; BELAGANAHALLI, M.N.; SAMY, A.M.; REDA, A.A.; AL-RASHID, S.A.; EL BATEL, M.; OURA, C.A.; MERTENS, P.P. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.17, n.5, p.886-889, 2011.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; PULLINGER, G.; NOMIKOU, K.; MORECROFT, E.; GUIMERA, M.; BELAGANAHALLI, M.N.; MERTENS, P.P. The genome sequence of bluetongue virus type 10 from India: evidence for circulation of a Western topotype vaccine strain. **Journal of Virology**, Baltimore, v.86, n.10, p.5971-5972, 2012.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; BELAGANAHALLI, M.N.; RAO, P.P.; SINGH, K.P.; HEMADRI, D.; PUTTY, K.; KUMAR, A.; BATRA, K.; KRISHNAJYOTHI, Y.; CHANDEL, B.S.; NOMIKOU, K.; MERTENS, P.P.C. Full-genome sequencing as a basis for molecular epidemiology studies of bluetongue virus in India. **PLoS One**, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131257>>. Acesso em: 13 mar 2016.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; BELAGANAHALLI, M.N.; POTGIETER, C.A.; KUMAR, V.; BATRA, K.; WRIGHT, I.M.; KIRKLAND, P.D.; MERTENS, P.P.C. Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163014. 2016.

MACKAY, I.A.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MCLACHLAN, N.J.; JAGELS, G.; ROSSITTO, P.V.; MOORE, P.F.; HEIDNER, H.W. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. **Veterinary Pathology**, v.27, p.223-229, 1994.

MACLACHLAN, N.J.; CONLEY, A. J.; KENNEDY, P.C. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 643–651, 2000.

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

MACLACHLAN, N.J.; DREW, C.P.; DARPEL, K.E.; WORWA, G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. **Journal of Comparative Pathology**, v.141, p.1-16, 2009.

MACLACHLAN, N. J. Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise* v. 26, p. 163–171, 2010.

MACLACHLAN, N.J.; WILSON, W.C.; CROSSLEY, B.M.; MAYO, C.E.; JASPERSON, D.E.; BREITMEYER, R.E.; WHITEFORD, A.M. Novel serotype of Bluetongue virus, western North America. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.4, p.665-666, 2013.

MASON, J.H.; COLES, J.D.W.; ALEXANDER, R.A. Cultivation of bluetongue virus in fertile eggs produced on vitamin deficient diet. *Nature*, v. 145, p.1022–1023, 1941.

MATOS, A. C. D.; ROSA, J. C. C.; NOMIKOU, K.; GUIMARÃES, L. L. B.; COSTA, É. A.; GUEDES, M. I. M. C.; MERTENS, P. P. C. Genome Sequence of Bluetongue virus Serotype 17 Isolated in Brazil in 2014. **Genome Announcements**, v.4, n.5, p.1161–16, 2016.

MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Comércio exterior brasileiro**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 jun. 2016.

MARTINS, M.S.N.; NOGUEIRA, A.H.C.; PITUCO, E.M.; DE STEFANO, E. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da língua azul em búfalos do Pará. **Biológico**, São Paulo, v.73, p.224-227, 2011.

MATRADE. **Marketing of halal products in Saudi Arabia**. Kuala Lumpur: Malasya Trade, 2005, p.14.

MAYO, C. E. et al. Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. **Transboundary and Emerging Diseases** v. 57, p. 277–281, 2010.

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

MELLOR, P.S. Culicoides: vectors, climate change and disease risk. **Veterinary Bulletin**, London, v.66, n.4, p.301-306, 1996.

MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. **Annual Review of Entomology Journal**, California, v. 45, n.3, p.07-40, 2000.

MELLOR P.S. Replication of arboviruses in insect vectors. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.123, p.231-247, 2000.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O. et al. Anticorpos para o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.1, 2000.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.1, p.19-20, 1999.

MELVILLE L.F. 2004. Bluetongue surveillance methods in na endemic area: Australia. In Bluetongue, Part I (NJ. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October 2003 **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 40, n. 3, p. 184-187.

MELVILLE L. et al. Forty years continuous monitoring for bluetongue vírus at an Australian site of high arbovirus activity. What have we achieved **Veterinaria Italiana**, 2015, Teramo, v. 51 n. 4, p. 263-267. BT Conference 2014 Rome, 5-7 november 2014.

MEHLHORN, H. et al. Bluetongue disease in Germany (2007–2008): monitoring of entomological aspects. **Parasitology Research**, v.105, p.313–319, 2009.

MENZIES, F.D. et al. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. **Veterinary Record**, v. 163, p. 203–209, 2008.

MERINO MENA C. X. Identificación de anticuerpos precipitantes para el virus de la lengua azul en suero de ovinos de la parte alta y baja de la Provincia de Pichincha. Bachelor Thesis. **Facultad de Ingeniería Y Ciencias Agropecuarias. Universidad de las Américas**, Quito, Ecuador, 2011.

MERTENS, P.P; BROWN, F.; SANGAR, D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. **Virology** v.135 n.1, p.207–217, 1984.

MERTENS, P. P.; MAAN, S.; SAMUEL, A.; ATTOUI, H. *Orbivirus*, **Reoviridae**. London: Elsevier/Academic Press, 2005, p. 466–483.

MERTENS, P.P.C.; ATTOUI,H.; MELLOR, P.S.*Orbivirus*.In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). **Encyclopedia of Virology**, Oxford: Elsevier. p. 454-465, 2008.

MERTENS, P.P.C.; ATTOUI, H; HOUSSAM, D.H.B. **Os RNAs e proteínas do vírus dsRNA**. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BLUET-EN.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2015.

MICHELSEN, P.G. Língua azul. In: SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. V.1. São Paulo: Manole, 1990. p.728-731.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Sanidade animal. MAPA. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/saude-animal>>. Acesso em: 15 mai 2016.

MO, C.L.; THOMPSON, L.H.; HOMAN, E.J.; OVIEDO, M.T.; GREINER, E.C.; GONZALEZ, J.; SAENZ, M.R. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in central America and the caribbean. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.211-215, 1994.

MORRISON, T.M.; WEIS, J.J.; WITTEWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I Monitoring during amplification. **Biotechniques**, v.24, p.954-962, 1998.

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

MURRAY, P.K.; EATON, B.T. Vaccines for bluetongue. **Australian Veterinary Journal**, East Melbourne, v.73, n.6., p.207-210, 2006.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia da PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67, n.10, p.7-19, 2012.

NEGRI FILHO, L.C.; MARCASSO, R.A.; NOGUEIRA, A.H.C.; OKUDA, L.; DE STEFANO, E.; PEREIRA, C.E.S.; VERONEZ, J.V.; VIEIRA, M.V.; RODRIGUES, S.M.C.; FURLAN, F.; PEREIRA, G.R.; GOMES, M.G.T.; KOETZ JR, C.; PITUCO, E.M.; OKANO, W. Detection of bluetongue virus antibodies in cattle of porto nacional city, Tocantins, Brazil. In: XXVII Brazilian Congress of Virology & XI Mercosur Meeting of Virology September, 18 - 21, 2016, Pousada dos Pireneus Resort, Pirenópolis, Goiás, Brazil. **Anais**. p.127, 2016.

NOGUEIRA, A.H.C.; CARDOSO, T.C.; PITUCO, E.M., DE ESTEFANO, E., CHIEBAO, D.P., CURCI, V.C.L.M. Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Língua azul (BTV) em ovinos da região Noroeste do Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto, 20. São Paulo, 2008. **O Biológico**, São Paulo, v.69, p.115, 2008.

NOGUEIRA, A. H. C.; STEFANO, E.; MARTINS, M. S. N.; OKUDA, L. H.; LIMA, M. S.; SILVA, T.G.; HELLWIG, O. H.; LIMA, J. E. A.; SAVINI, G.; PITUCO, E.M. Prevalence of Bluetongue virus serotype 4 in cattle in the State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 52, p. 319-323, 2016.

NOMIKOU,K.; HUGHES,J.; WASH,R,; KELLAM,P.; BREARD,E.; ZIENTARA,S.; PALMARINI,M.; BIEK,R.; MERTENS,P. Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.11, n.8, 2015.

NURK, S.; BANKEVICH, A.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.A.; KOROBAYNIKOV, A.; LAPIDUS, A.; PRJIBELSKI, A.D.; PYSHKIN, A.; SIROTKIN, A.; SIROTKIN, Y.; STEPANAUSKAS, R.; CLINGENPEEL, S.R.; WOYKE, T.; MCLEAN, J.S.; LASKEN, R.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.A.; PEVZNER, P.A. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. **American journal of bioinformatics and computational biology**. Columbia, v.20, n.10, p.714-737, 2013.

OIE (World Organisation for Animal Health). 2016. **World Animal Health Information Database (WAHIS interface)**. Exceptional epidemiological events, Brazil. WorldOrganisationforAnimalHealth,Paris,France. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryreports>. Acesso em: Set. 2016.

OIE. World Organisation for Animal Health .**Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals** 2016. Chapter 2.1.3. Bluetongue. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf <<http://> Acesso em Nov. de 2016.

OIE. World Organisation for Animal Health. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2016** Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016/> Acesso em nov de 2016.

OIE. World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code 2016. **CHAPTER 8.3. INFECTION WITH BLUETONGUE VIRUS**. Disponível

<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/> Acesso em Nov. de 2016.

OSBURN, B.I. Third international symposium on bluetongue. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v.40, n.3, 2004.

OSBURN, B.I. Bluetongue virus. **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n.3, p.547-560, 1994a.

OSBURN, B.I. The impact of bluetongue virus on reproduction. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, n.3/4, p.189-196, 1994b.

OURA, C.A.; EL HARRAK, M. Midge-transmitted bluetongue in domestic dogs. **Epidemiology Infection**, v.139, p.1396–1400, 2011.

PANDOLFI, J.R.C.; TAMANINI, M.L.F.; ARAÚJO JR., J.P. et al. Presence of Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease of deer virus infections in a population of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dyctotomus*) living in southwest of São Paulo and in northeast of Mato Grosso do Sul state, in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.3., supl.1, p.56, 1998.

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

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

PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Doenças da reprodução em bovinos no Pantanal: ocorrência de animais soropositivos para os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarréia bovina a vírus e língua azul. Corumbá: Embrapa Pantanal, 1997. 7p. (comunicado técnico, 20).

PERSING, D. Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. Diagnostic molecular microbiology – principles and applications. Washington: **Library of Congress Cataloging-in-Publication Data**, 1993.n.20, cap.4, p.88-104b

PINHEIROS, F.P.; ROSA, A.P.A.T.; VASCONCELOS, P.F.C. Febre por Oropouche. In: Leão RNQ, organizador. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: Editora Cejup, 1997. p.285-298.

POSADA, D. AND K. A. CRANDALL. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, n.9, p.817-818, 1998

POTGIETER, A.C.; MONACO, F.; MANGANA, O.; NOMIKOU, K.; YADIN, H.; SAVINI, G. VP2-segment sequence analysis of some isolates of bluetongue virus recovered in the Mediterranean basin during the 1998-2003 outbreak. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, Berlin, v.52, e. 9, p. 372-379, 2005.

POWLEDGE, T.M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**, v.28, n.2, p.44-50, 2004.

PULLINGER, G.D. et al. Identification of the Genome Segments of Bluetongue Virus Serotype 26 (Isolate KUW2010/02) that Restrict Replication in a *Culicoides sonorensis* Cell Line (KC Cells). **PLoS One**, v.11, n.2, p.e0149709, 2016.

PURSE, B.V.; MELLOR, P.S.; ROGERS, D.J.; SAMUEL, A.R.; MERTENS, P.P.C.; BAYLIS, M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. **Nature Reviews Microbiology**, California, v.3, p.171-181, 2005.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Veterinary Medicine: a Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horse**. 8 ed. London: Bailliere Tindall, 1994. p.1763.

REBOUÇAS, N.A. *Biologia molecular aplicada à medicina: fundamentos teóricos e práticos*, 1.ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 66 p. [**Apostila**]

REDDINGTON, J.J.; REDDINGTON, G.M.; MACLACHLAN, N.J. Competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.3, p.144-147, 1991.

REDDY, V.Y.; RAO, P.P.; REDDY, N.Y.; HEGDE, N.R. Phylogenetic analysis of Indian isolates of Bluetongue vírus. **Unpublished**, Srivenkateswara, 2016.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. *Viroses confundíveis com Febre Aftosa*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.2, p.323-332, 1996.

RIJT, R.V.D.; BOOM, R.V.D.; JONGEMA, Y.; SLOET, M.M.; OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, V. *Culicoides species attracted to horses with and without insect hypersensitivity*. **The Veterinary Journal**, New York, v.178, n.1, p.91-97, 2008.

ROACH, J.C.; BOYSEN, K.; WANG, A.; HOOD, L. *Pairwise end sequencing: a unified approach to genomic mapping and sequencing*. **Genomics**, London, v.26, n.2, p.345–353, 1995.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B.; GORTÁZAR, C.; RUIZ-FONS, F.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. *Bluetongue Virus Serotypes 1 and 4 in Red Deer, Spain*. **Journal Emerging Infectious Diseases**, Foster City, v.16, n.3, p.518-520, 2010.

RONAGHI, M. et al. *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. **Science**, v.281, p.363–365, 1998.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome research**, v.11, p.3-11, 2001.

RONDEROS, M. M.; SPINELLI, G.R.; LAGER, I.; DIAZ, F. La importancia sanitaria de los jevenes del género *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) em la Argentina. **Entomología y vectores**, Mission, v.10, n.4, p.601-612, 2003.

ROSA, J. C. C; GUEDES, M. I. M. C; MATOS, A. C. D.; COSTA, E. A.; GUIMARÃES, L. L. B.; LEAL, C. A. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; NOMIKOU, K.; MERTENS, P. P. C.; DRIEMEIER, D.; LOBATO, Z. I. P. Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in Rio Grande do Sul State, Brazil, 2014. In “IV Conferenza Internazionale sulla Bluetongue”, Roma-Itália, 2014a.

ROSA, J. C. C; MATOS, A. C. D.; COSTA, E. A.; BIIHRER, D. A.; RAYMUNDO, D. L.; GUEDES, M. I. M. C; NOMIKOU, K.; MERTENS, P. P. C.; DRIEMEIER, D.; LOBATO, Z. I. P. Outbreak of bluetongue virus serotype 4 in Larvas, Minas Gerais State, Brazil, 2012. In “IV Conferenza Internazionale sulla Bluetongue”, Roma-Itália, 2014b.

ROY, P. Bluetongue virus proteins. **Journal of General Virology**, London, v.73, p.3051-3064, 1992.

RUIZ-FONS, F.; ÁLVARO, R.R.G.; ALCAIDE, V.; GORTÁZAR, C. Spatial and Temporal Evolution of Bluetongue Virus in Wild Ruminants, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, Foster, v.14, n.6, p.951-953, 2008.

RUSSEL, H.; O'TOOLE, D.T.; BARDSLEY, K.; DAVIS, W.C.; ELLIS, J.A. Comparative effects of bluetongue virus infection of ovine and bovine endothelial cells. **Veterinary Pathology**, Washington, v.33, n.3, p.319-331, 1996.

SAENZ, M.R.; GREINER, E.C. *Culicoides* aspirated from cattle in Costa Rica, Honduras, Panama and Puerto Rico, and their role as potential vectors of bluetongue virus. **Review of Medical Entomology**, Honolulu, v.8, p.15-19, 1994.

SANCHEZ-CORDON, P. J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B.; RISALDE, M.A.; MOLINA, V.; PEDRERA, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.

Immunohistochemical detection of bluetongue virus in fixed tissue. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, N.1, p. 20-28, 2010.

SAEGERMAN, C. BOLKAERTS, B.; BARICALLA, C.; RAES, M.; WIGGERS, L.; DE LEEUW, I.; VANDENBUSSCHE, F.; ZIMMER, J.Y.; HAUBRUGE, E.; CASSART, D.; DE CLERCQ, K; KIRSCHVINK, N. The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype 8 infection on reproductive performance in sheep. **Veterinary Journal**, v.87, N.1, p.72–80, 2011.

SAEGERMAN, C.; BERKVEN, D.; MELLOR, P.S. Bluetongue epidemiology in the European union. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 539–544, 2008.

SAMAL, S. K.; LIVINGSTON, C.W.; MCCONNELL, S.; RAMIG, R.F. Analysis of mixed infection of sheep with bluetongue virus serotypes 10 and 17: evidence for genetic reassortment in the vertebrate host. **Journal of Virology**, London, v.61, p.1086–1091, 1987.

STOTT, J.L.; OBERST, R.D.; CHANNELL, M.B.; OSBURN, B.I. Genome segment reassortment between two serotypes of bluetongue virus in a natural host. **Journal of Virology**, London, v.61, p.2670–2674, 1987.

SANTARÉM, M. C. A.; CONFALONIERI, U. E. C.; FELIPPEBAUER, M. L. Diversidade de Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) na Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Levilândia, v.1, ed.4, p. 29-33, 2010.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; VAN WUJCKHUISE, L.; VELLEMA, P.; VAN RIJN, P.A. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 in Dutch dairy herds in 2007. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n.1-2, p. 31–35, 2010.

SARAIVA, J.F.; PICANÇO SOUTO, R.N.; FERREIRA, R.M.A. Flebotomíneos (Díptera: *Phlebotomidae*) coletados em um assentamento rural no estado do Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**, Manaus, v.1, n.1,p.59-63, 2011.

SAVINI, G.N.; JAMES MACLACHLAN, N.J.; SANCHEZ-VIZCAINO, J.M.; ZIENTARA, S. Vaccines against bluetongue in Europe. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, Oxford, v.31, p.101-120, 2008.

SAVINI, G.; HAMERS C; CONTE, A.; MIGLIACCIO, P.; BONFINI, B.; TEODORI, L.; DI VENTURA, M.; HUDELET, P.; SCHUMACHER, C.; CAPORALE, V. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.133, n.1-2, p.1–8, 2009.

SAVINI, G.; AFONSO, A.; MELLOR, P.; ARADAIB, I.; YADIN, H.; SANAA, M.; WILSON, W.; MONACO, F.; DOMINGO, M. Epizootic haemorrhagic disease. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n.1-2, p. 1–17, 2011.

SAVINI, G. Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: a retrospective analysis in Italy. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n.1, p.69-74, 2014.

SAVINI, G.; PUGGIONI, G.; MELONI, G.; MARCACCI, M.; DI DOMENICO, M.; ROCCHIGIANI, A.M.; SPEDICATO, M.; OGGIANO, A.; MANUTA, D.; TEODORI, L.; LEONE, A.; PORTANTI, O.; CITO, F.; CONTE, A.; ORSINI, M.; CAMMÀ, C.; CAALISTRI, P.; GIOVANNINI, A.; LORUSSO, A. Novel putative Bluetongue virus in healthy goats from Sardinia, Italy. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 51, p.108-117, 2017.

SCHMAHL, G. Pilot study on deltamethrin treatment (Butox, Versatrine) of cattle and sheep against midges. **Parasitology Research**, v. 104, p. 809–813. 2009.

SCHROEDER, M.E.; JOHNSON, D.J.; OSTLUND, E.N.; MEIER, J.; BOUNPHENG, M.A.; CLAVIJO, A. Development of a Simple Streamlined Method for Nucleic Acid Purification, Denaturation and Multiplex Detection of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease Viruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.25, n.6, p.709-19, 2013.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.P.C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BREARD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Veterinary Research**, London, v.39, n.5, p.46, 2008.

SEKI, F.; ONO, N.; YAMAGUCHI, R.; YANAGI, Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. **Journal Virology**, London, v.77, p.9943–9950, 2003.

SILVA, F.D.F.; OKADA, Y.; FELIPPE-BAUER, M. L. *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) da vila de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Levilândia, v.1, n.3, p.69-74, 2010

SILVA, C.S.; FELIPPE-BAUER, M.L.; ALMENIDA, E.H.G.; FIGUEIREDO, L.R. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. I. Região Norte: Município de Campo dos Goytacazes. **Entomología y Vectores**, Mission, v.8, n.3, p.349-358, 2001.

SILVA, F. S.; REBÊLO, J. M. M. Espécies de *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) da ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, v.15, p.169-79, 1999.

SILVA, M. X. **Soroprevalência da Língua Azul em caprinos e sua associação com indicadores de tecnologia em propriedades do Ceará**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2002.

SINGER, R.S.; MACLACHLAN, N.J.; CARPENTER, T.E. Maximal predicted duration of viremia in bluetongue virus-infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.13, p.9-43, 2001.

Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA Disponível em:

<www.sidra.ibge.gov.br/> Acesso em: 15 jan. 2016.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v.26, n.10, p.1135-1145, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/abs/nbt1486.html>>. Acesso em: 5 jun. 2016.

SHIRAFUJI, H.; YANASE, T.; KATO, T.; YAMAKAWA, M. Genetic and phylogenetic characterization of genome segments 2 and 6 of bluetongue virus isolates in Japan from 1985 to 2008. **Journal of general virology direct**, London, v. 93, p. 1465-1473, 2012.

SPERLOVA, A.; ZENDULKOVA, D. Bluetongue: a review. **Veterinarni Medicina**, v.56, n.9, p. 430–452. 2011.

SUN, E. C. et al. Emergence of a Novel Bluetongue Virus Serotype, China 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2016.

SWOFFORD, D.L. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10**. Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA, 2003

TABACHNICK, W. J.; HOLBROOK, F. R. The *Culicoides variipennis* complex and the distribution of the bluetongue viruses in the United States. *Proceedings of the USA Animal Health Association*, v. 96, p. 207-212, 1992.

TAMAYO R.; SCHOEBITZ, R.; ALONSO, O.; WENZEL, J. First report of bluetongue antibody in Chile. **Progress in Clinical and Biological Research Journal**, v. 178, p. 555-558, 1985.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STEICHE; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TESSARO, S.V.; CLAVIJO, A. Duration of bluetongue viremia in experimentally infected American bison. **Journal of wildlife Diseases**, Iowa, v.37, n.4, p.722-729, 200.

TOMICICH, R.G.P. et al. 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**, Belo Horizonte, v.61, n.5, p.1222-1226, 2009.

TOMORI, O.; BABA, S.; ADU, F.; ADENIJI, J. An overview and perspective on orbivirus disease prevalence and occurrence of vectors in Africa. In: WALTON, T.E.; OSBURN, B.I. (Ed.). **Bluetongue African Horse Sickness and related orbiviruses**. 1992, p.23-33.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Barcelona, v.25, n.9, p.1105–1111, 2009.

TRINDADE, R. S.; GORAYEB, I. S. Jejenes (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), luego de la estación de lluvias, en la Reserva de Desarrollo Sostenible Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Levilândia, v.1, n.2, p. 121-30, 2010.

TRINDADE, R. S.; GORAYEB, I. S. Maruins (Ceratopogonidae: Diptera) do estuário do Rio Pará e do litoral do Estado do Pará, Brasil. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v.12, n.1, 61-74p., 2005

UHART, M.M.; VILA, A.R.; BEADE, M.S. et al., Health evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. **Journal Wildlife Diseases**, Barcelona, v.39, p.887-893, 2003.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, Bethesda, v.29, n.3, p.151-159, 2005.

VANBINST, T. VANDENBUSSCHE, F.; DERNELLE, E.; DE CLERCQ, K. A duplex real-time RT-PCR for detection of bluetongue virus in bovine semen. **Journal Virological Methods**, v.169, n.1, p.162-168, 2010.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1**. Abril 2013. Disponível em : < http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf> Acesso em :20 Jun. 2016.

VERAS, R. S.; CASTELLÓN, E. G. *Culicoides Latreille*. (Diptera: Ceratopogonidae) in Brazilian Amazon. V. Efficiency of traps and baits and vertical stratification in the forest reserve Adolpho Ducke. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.15, n.1, p.145-52, 1998.

VERWOERD, D.; ERASMUS, B.J. Bluetongue. In: Coetzer, J.A.; Tustin, R.C. (Eds.) **Infectious diseases of livestock**. 2nd. Ed. Oxford University Press, 2004. p.1201-1220.

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

VERDEZOTO, J.; BREARD, E.; VIAROUGE, C.; QUENAULT, H.; LUCAS, P.; SAILLEAU, C.; ZIENTARA, S.; AUGOT, D.; ZAPATA, S. Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. **Transboundary Emerging Disease**, p.1–4, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28239988>>. Acesso em 21 Mai. 2017.

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

WARD, M.P.; THURMOND, M.C. Climatic factors associated with risks of seroconversion of cattle to bluetongue viruses in Queensland. **Preventive Veterinary Medical**, v.24, p.129-136, 1995.

WARD, M.P. Climatic factors associated with the prevalence of bluetongue virus infection of cattle herds in Queensland, Australia. **Veterinary Research**, v.134, p.407-410, London, 1994.

WECHSLER, S.J.; MCHOLLAND, L.E. Susceptibility of 14 cell lines to bluetongue virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2324-2327, 1988.

WHEELER, D.; BURROWS, M. A block-sorting lossless data compression algorithm.
Digital Systems Research Center Report, 124, 1994

WILBUR, L. A.; WILBURG, L.A.; EVERMANN, J.F.; LEVINGS, R.L.; STOLL,I.R.;
STARLING, D.E.; SPILLERS, C.A.; GUSTAFSON, G.A.; MCKEIRNAN, A.J.; Abortion
and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue
virus. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 204, n.11,
p.1762–1765, 1994.

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

WILSON, A.J.; MELLOR, P.S. Bluetongue in Europe: past, present and future.
Philosophical Transactions the Royal Society Biological Science, v.364, n.1530, p.2669-
2681, 2009.

WILSON, A.; MELLOR, P. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate
change. **Parasitology Research**, v.103, p.69-77, 2008.

WILSON, D.C.; MA, H.C.; VENTER, E.H.; VAN DJIK, A.A.; SEAL, B.S.; MECHAM,
J.O.; Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7, **Virus Research**,
v.67, p.141-151, 2000.

WILSON, W.C.; CHASE, C.C.L. Nested and multiplex polymerase chain reactions for the
identification of bluetongue virus infection in the biting midge, *Culicoides variipennis*.
Journal of Virological Methods, v.45, p.39-47, 1993.

WITTMANN, E.J.; BAYLIS, M. Climate change: effects on *Culicoides* transmitted viruses
and implications for the UK. **Veterinary Journal**, v.160, p.107-117, 2000.

WIRTH, W.W.; DYCE, A.L.; SPINELLI, G.R. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). **Control American Entomology Institute**, v.25, n.1, p.1-784, 1988.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus infected semen. **Theriogenology**, v. 65, p.247-274, 2006.

YANG, T.; LIU, N.; XU, Q.; SUN, E.; QIN, Y.; ZHAO, J.; FENG, Y.; WU, D. Bluetongue virus 1 strain SZ97/1 segment 2, complete sequence. **Veterinary Journal**, Nangang, v.86, p.1288-1289 2012.


ZENDULKOVA D, POSPISIL Z. Bluetongue and its possible impact on production and quality of food of animal origin (in Czech). **Scientific Report for the Veterinary Committee for Food Safety**, Brno, p.18, 2007.

ZIENTARA, S.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. Control of bluetongue in Europe. **Veterinary Microbiology**, v.165, n.1-2, 2013.

ZIENTARA S. et al. Novel bluetongue virus in goats, corsica, france, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 2123-2125, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Trabalho no Comitê de Ética (Frente)



 SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
 INSTITUTO BIOLÓGICO

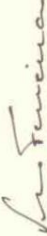
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 31/07, sobre o Projeto de Pesquisa: **"Isolamento, identificação e estudo molecular do vírus língua azul a partir de amostra de sangue e sêmen de ruminantes do Estado de São Paulo"**, sob a responsabilidade da Dra. Edviges Maristela Pituco, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 18 de julho de 2007.

São Paulo, 18 de julho de 2007.


Dra. Vera Cecilia Annes Ferreira
 Coordenadora da CETEA-IB

ANEXO 1 - Comissão de ética (Verso)

CETEA - IB

Registro

Número : 31/07

Livro : 01

Folha : 32

Data: 22/08/12

ANEXO 2 – Tabela de resultados do sequenciamento

Tabela 21 - Os resultados obtidos após as análises de bioinformática, foram separados por sorotipo conforme a identificação animal, espécie, cidade/região e Estado de ocorrência.

Nº	Identificação animal	Espécie	Cidade-Estado	Resultado
1	LVB/13 4175	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-1
2	LVB/14 9946	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	BTV-1
3	LVB/14 9947	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	BTV-1
4	LVB/14 9949	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	BTV-1
5	LVB/14 9965	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	Inconclusivo
6	LVB/14 9983	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-1
7	LVB/14 9984 Pool	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-1
8	LVB/14 9984 SNC	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-1
9	LVB/14 9985 Pool	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-1
10	LVB/14 9985 SNC	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-1
11	LVB/15 461	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense – Rio de Janeiro	BTV-1
12	LVB/15 462	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-1
13	LVB/13 4171	Bovino	Sertãozinho – São Paulo	Inconclusivo
14	LVB/13 4187	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	Inconclusivo
15	LVB/14 10466	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	BTV-3
16	LVB/14 9990	Ovino	Itapetininga – São Paulo	BTV-3
17	PAG08 13	Caprino	Itu - São Paulo	BTV-4
18	LVB/13 1709H	Ovino	Araçatuba – São Paulo	BTV-4
19	LVB/13 1709I	Ovino	Araçatuba – São Paulo	BTV-4
20	LVB/14 1574	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-4
21	LVB/14 9967	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-4
22	LVB/14 9976	Ovino	Sorocaba - São Paulo	BTV-4
23	LVB/14 9977	Ovino	Sorocaba - São Paulo	BTV-4
24	LVB/14 9978	Ovino	Sorocaba – São Paulo	Inconclusivo
25	LVB/14 9980	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-4
26	LVB/14 11577	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-8
27	LVB/13 30 290	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-8
28	LVB/13 30 292	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-8
29	LVB/13 4170	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-9
30	LVB/14 2680	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-10
31	LVB/14 1575	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-10
32	LVB/14 2682	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-10
33	LVB/14 2683	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-10
34	LVB/14 9979	Ovino	Sorocaba - São Paulo	BTV-11
35	RAG/09 1398	Feto bovino	Martinópolis- São Paulo	BTV-12

36	LVB/13 4058	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-12
37	LVB/13 4173	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-12
38	LVB/14 16185	Bovino	Sertãozinho - São Paulo	BTV-12
39	LVB/14 9953	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	BTV-12
40	LVB/14 9956	Ovino	Nova Odessa - São Paulo	BTV-12
41	LVB/14 9974	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-12
42	LVB/14 9989	Ovino	Itapetininga – São Paulo	BTV-12
43	PAG/08 12	Caprino	Itu - São Paulo	BTV-13
44	LVB/14 5772	Bovino	Sertãozinho - São Paulo	BTV14
45	LVB/15 2732	Bovino	Sertãozinho - São Paulo	BTV-14
46	LVB/14 4430	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-18
47	LVB/14 2180	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-18
48	LVB/13 30267	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-18
49	LVB/14 2181	Ovino	Vale do Paraíba Fluminense - Rio de Janeiro	BTV-18
50	LVB/13 30290	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-19
51	LVB/15 2073	Bovino	Sertãozinho - São Paulo	BTV-19
52	LVB/15 2247	Bovino	Sertãozinho - São Paulo	BTV-19
53	LVB/13 30 304	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-22
54	LVB/13 30292	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-22
55	LVB/13 30304	Cervo	Jaboticabal - São Paulo	BTV-22
56	LVB/14 9970	Ovino	Itapetininga - São Paulo	BTV-22
57	LVB/13 10359	Cervo	Castilho – São Paulo	BTV-22
58	LVB/14 9981	Ovino	Araçatuba - São Paulo	BTV-24

ANEXO 3 - Tabela com as sequências de referência obtidas no GenBank
Tabela 22 - Sequências obtidas no GenBank e utilizadas como referência para a realização da análise filogenética do VLA das amostras sequenciadas, bem como o número de acesso, país em que o vírus foi isolado, o ano e os artigos publicados.

Sorotipo de referência	Nº de acesso	País onde foi isolado	Ano	Artigos publicados
BTV-1	AJ585122	África do Sul	1982-2003	Maan, et al. (2004)b; Yang et al. (2012)
	KM00995381	Austrália	2005	Boyle et al. (2014)
	AJ585110	África do Sul *	1982-2003	Maan, et al. (2004)b
	KX164020	Estados Unidos	2010	Johnson et al. (2016)
BTV-2	AB686221	Japão	1985-2008	Shirafuji et al. (2012)
	JQ88222491	Estados Unidos	2010	Maclachla et al.(2013)
BTV-3	KP821039	Europa, Países da região mediterrânea da África e Turquia	1958-2012	Nomikou et al. (2015)
BTV-4	DQ191277	Itália, Grécia, Israel	1983-2003	Potgieter et al. (2005)
	AJ585125	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
	JX024955	Argentina	2002	Legisa et al. (2013)
	KP821054	Europa, Países da região mediterrânea da África e Turquia	1958-2012	Nomikou et al. (2015)
BTV-5	AJ585126	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-6	AJ585127	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-7	AJ585128	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-8	AJ585129	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-9	AJ585130	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
	KX442583	Equador	2014	Viarouge et al. (2015)
BTV-10	AJ585131	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
	KP339245	Índia	2003	Reedy et al. (2016)
	JQ740772	Índia*	2004	Maan et al. (2012)
BTV-11	AJ585133	África do Sul	1983	Maan et al. (2004)b
BTV-12	KP821100	Europa, Países da região mediterrânea da África e Turquia.	1958-2012	Nomikou et al. (2015)
	KX164090	Estados Unidos	2012	Johnson et al. (2016)
BTV-13	DO01531	Estados Unidos	1987	Fukusho et al. (1987)
BTV-13	AJ585135	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-14	AJ585135	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
	KX164110	Estados Unidos	2003	Johnson et al. (2016)
BTV-15	AJ585136	África do Sul	1983-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-16	AJ585137	África do Sul	1983-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-17	AJ585138	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-18	AJ585139	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
	KX164120	Estados Unidos	2014	Johnson et al. (2016)
BTV-19	JX272430	África do Sul	2012	Koekemoer et al. (2013)
	AJ585140	África do Sul	1982-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-20	AJ585141	África do Sul	1975	Maan et al. (2004)b
BTV-21	AJ585142	África do Sul	1979	Maan et al. (2004)b
BTV-22	AJ585143	África do Sul	1983-2003	Maan et al. (2004)b

	KX164140	Estados Unidos	2005	Johnson et al. (2016)
BTV-23	AJ585144	África do Sul	1983-2003	Maan et al. (2004)b
BTV-24	AJ585145	África do Sul	1987	Maan et al. (2004)b
BTV-25	EU839884	Suíça	2008	Hofmann et al. (2008)
BTV-26	HM590642	Kuwait	2010	Maan et al. (2011)
BTV-27	KM200718	França	2014	Jenckel et al. (2015)
BTV- XILT2015	KX234079	Itália	2015	Savini et al. (2017)

*Provável origem vacinal

ANEXO 4 – Tabela com os resultados do percentual das análises de identidade

Tabela 23 - Resultados do percentual das análises de identidade entre as amostras analisadas e os 28 sorotipos do VLA, com base na sequência de nucleotídeos do segmento 2, região ORF da proteína VP2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 01	-	0.24548	0.03363	0.59940	0.45833	0.13504	0.71837	0.55873	0.12851	0.12851
2 02	489	-	0.25151	0.62600	0.52811	0.26606	0.71536	0.57681	0.25602	0.26155
3 03	67	501	-	0.59488	0.45582	0.13102	0.71938	0.56175	0.12550	0.12450
4 04	1194	1247	1185	-	0.66215	0.57279	0.71536	0.62349	0.57882	0.58685
5 05	913	1052	908	1319	-	0.43223	0.72289	0.67219	0.42169	0.40964
6 06	269	530	261	1141	861	-	0.70833	0.52008	0.03665	0.04418
7 07	1431	1425	1433	1425	1440	1411	-	0.71185	0.70884	0.70934
8 08	1113	1149	1119	1242	1339	1036	1418	-	0.53012	0.53313
9 09	256	510	250	1153	840	73	1412	1056	-	0.03414
10 10	256	521	248	1169	816	88	1413	1062	68	-
11 11	713	883	704	1304	594	611	1451	1377	591	561
12 12	998	989	987	1288	1340	1012	1447	1240	1002	995
13 13	1003	987	999	1305	1355	1014	1427	1214	1006	1001
14 14	1362	1363	1357	1379	1379	1372	1454	1396	1366	1359
15 15	1356	1363	1353	1378	1378	1370	1456	1392	1365	1359
16 16	1117	1135	1117	1381	1411	1134	1441	1387	1123	1124
17 17	1119	1139	1119	1385	1414	1136	1441	1387	1126	1127
18 18	1441	1447	1444	1443	1452	1429	1450	1436	1431	1429
19 19	1442	1447	1443	1444	1453	1430	1450	1437	1432	1430
20 20	1441	1428	1441	1446	1455	1439	1462	1422	1440	1439
21 21	1443	1446	1444	1444	1453	1431	1451	1438	1433	1431
22 22	1420	1425	1415	1426	1445	1420	1462	1429	1419	1423
23 23	1429	1443	1431	1452	1450	1435	1464	1431	1433	1430
24 24	1427	1439	1428	1454	1454	1431	1465	1427	1429	1426
25 25	1429	1444	1432	1452	1449	1435	1465	1432	1433	1431
26 26	1439	1451	1436	1464	1500	1448	1478	1464	1449	1444
27 27	1443	1439	1433	1435	1492	1459	1449	1453	1462	1460
28 28	1447	1449	1445	1459	1424	1440	1418	1462	1439	1435
29 29	1334	1321	1338	1415	1448	1331	1490	1384	1341	1332
30 30	1421	1422	1421	1433	1488	1431	1418	1448	1427	1423
31 31	1286	1297	1297	1387	1468	1290	1451	1382	1288	1297
32 32	1295	1285	1282	1460	1264	1273	1413	1449	1266	1267
33 33	1344	1371	1348	1400	1444	1353	1472	1397	1359	1349
34 34	1331	1367	1329	1402	1437	1339	1468	1384	1342	1337
35 35	1331	1348	1330	1392	1445	1339	1471	1378	1334	1333
36 36	1426	1435	1426	1433	1464	1422	1429	1420	1425	1429
37 37	1426	1438	1426	1436	1449	1425	1436	1434	1423	1424
38 38	1429	1435	1428	1425	1450	1419	1431	1423	1422	1423
39 39	1412	1443	1414	1425	1444	1411	1429	1411	1418	1419
40 40	1412	1443	1414	1425	1444	1411	1429	1411	1418	1419
41 41	1438	1450	1444	1450	1471	1446	1458	1443	1446	1442
42 42	1460	1446	1460	1435	1453	1446	1477	1455	1456	1466
43 43	1458	1453	1451	1432	1460	1452	1472	1445	1457	1464
44 44	1469	1463	1465	1452	1469	1465	1448	1446	1472	1475
45 45	1469	1454	1464	1428	1479	1465	1460	1453	1469	1484
46 46	1456	1446	1452	1429	1471	1444	1456	1442	1452	1462
47 47	1462	1453	1459	1432	1471	1459	1463	1446	1466	1477
48 48	1456	1442	1447	1444	1456	1443	1458	1449	1453	1463
49 49	1454	1439	1443	1447	1459	1444	1454	1450	1454	1464
50 50	1449	1439	1441	1451	1458	1440	1462	1440	1451	1460
51 51	1459	1441	1453	1443	1454	1444	1458	1444	1453	1462
52 52	1106	1119	1102	1367	1414	1124	1426	1387	1108	1108
53 53	1113	1118	1112	1369	1403	1112	1435	1380	1099	1106
54 54	1430	1427	1429	1463	1459	1435	1476	1472	1438	1426
55 55	1434	1416	1422	1423	1456	1412	1423	1443	1418	1409
56 56	1420	1401	1413	1431	1451	1397	1430	1441	1401	1394
57 57	1429	1421	1423	1442	1458	1408	1421	1455	1415	1406
58 58	1112	1127	1115	1369	1404	1128	1427	1377	1126	1122
59 59	1503	1515	1497	1470	1489	1508	1462	1443	1506	1501
60 60	1452	1457	1459	1421	1457	1452	1432	1434	1453	1445
61 61	1288	1271	1277	1327	1376	1279	1470	1260	1270	1275
62 62	1281	1295	1274	1332	1388	1294	1447	1273	1280	1286
63 63	1281	1291	1270	1333	1390	1289	1458	1267	1277	1283
64 64	1280	1295	1270	1337	1394	1292	1455	1262	1280	1286
65 65	1290	1296	1280	1333	1388	1298	1469	1276	1286	1292
66 66	1372	1381	1375	1396	1429	1366	1453	1377	1367	1369
67 67	1233	1233	1233	1395	1311	1234	1447	1403	1241	1237
68 68	1491	1474	1482	1488	1483	1477	1483	1487	1471	1466

69	69	1433	1433	1439	1445	1488	1448	1511	1432	1456	1450
70	70	1417	1443	1419	1455	1477	1422	1449	1447	1423	1421
71	71	1429	1440	1425	1446	1453	1424	1418	1435	1429	1420
72	72	1433	1426	1432	1420	1490	1440	1428	1458	1432	1439
73	73	1460	1513	1461	1413	1474	1456	1445	1451	1457	1471
74	74	1475	1493	1474	1421	1467	1468	1456	1470	1465	1475
75	75	1469	1501	1475	1419	1475	1464	1452	1453	1467	1479
76	76	1468	1497	1473	1420	1475	1465	1453	1456	1466	1478
77	77	1465	1482	1468	1460	1447	1445	1448	1437	1451	1453
78	78	1468	1492	1473	1415	1465	1457	1466	1452	1463	1469
79	79	1258	1259	1253	1326	1377	1264	1451	1277	1257	1263
80	80	1415	1423	1423	1429	1431	1405	1464	1418	1414	1408
81	81	1299	1301	1302	1400	1416	1306	1442	1419	1302	1295
82	82	1424	1442	1424	1441	1488	1421	1429	1420	1430	1431
83	83	1352	1356	1358	1429	1474	1355	1430	1417	1361	1352
84	84	1349	1358	1355	1399	1461	1348	1460	1416	1353	1358

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences

Above diagonal: Mean character differences

		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	01	0.35793	0.50100	0.50351	0.68373	0.68072	0.56074	0.56175	0.72339	0.72390	0.72339
2	02	0.44327	0.49649	0.49548	0.68424	0.68424	0.56978	0.57179	0.72641	0.72641	0.71687
3	03	0.35341	0.49548	0.50151	0.68122	0.67922	0.56074	0.56175	0.72490	0.72440	0.72339
4	04	0.65462	0.64659	0.65512	0.69227	0.69177	0.69327	0.69528	0.72440	0.72490	0.72590
5	05	0.29819	0.67269	0.68022	0.69227	0.69177	0.70833	0.70984	0.72892	0.72942	0.73042
6	06	0.30673	0.50803	0.50904	0.68876	0.68775	0.56928	0.57028	0.71737	0.71787	0.72239
7	07	0.72841	0.72641	0.71637	0.72992	0.73092	0.72339	0.72339	0.72791	0.72791	0.73394
8	08	0.69127	0.62249	0.60944	0.70080	0.69880	0.69629	0.69629	0.72088	0.72139	0.71386
9	09	0.29669	0.50301	0.50502	0.68574	0.68524	0.56376	0.56526	0.71837	0.71888	0.72289
10	10	0.28163	0.49950	0.50251	0.68223	0.68223	0.56426	0.56576	0.71737	0.71787	0.72239
11	11	-	0.60492	0.62048	0.70080	0.70231	0.64006	0.64157	0.74498	0.74548	0.74799
12	12	1205	-	0.26707	0.66365	0.66165	0.57982	0.58233	0.72490	0.72540	0.73494
13	13	1236	532	-	0.63906	0.63906	0.56526	0.56827	0.71737	0.71687	0.72038
14	14	1396	1322	1273	-	0.01205	0.69528	0.69528	0.72791	0.72791	0.72590
15	15	1399	1318	1273	24	-	0.69428	0.69428	0.72791	0.72791	0.72841
16	16	1275	1155	1126	1385	1383	-	0.00703	0.72239	0.72289	0.73042
17	17	1278	1160	1132	1385	1383	14	-	0.72440	0.72490	0.73193
18	18	1484	1444	1429	1450	1450	1439	1443	-	0.00050	0.09438
19	19	1485	1445	1428	1450	1450	1440	1444	1	-	0.09388
20	20	1490	1464	1435	1446	1451	1455	1458	188	187	-
21	21	1485	1445	1429	1450	1450	1439	1443	2	1	186
22	22	1467	1446	1425	1442	1447	1417	1414	701	700	685
23	23	1480	1470	1433	1447	1447	1448	1450	201	200	212
24	24	1478	1467	1431	1446	1446	1444	1446	215	214	227
25	25	1479	1472	1435	1449	1449	1450	1452	198	197	210
26	26	1476	1456	1467	1472	1472	1491	1488	862	861	841
27	27	1512	1437	1445	1503	1507	1395	1396	1035	1034	1019
28	28	1450	1446	1450	1432	1430	1455	1458	1478	1478	1465
29	29	1421	1319	1319	1451	1448	1421	1423	1285	1284	1277
30	30	1482	1426	1425	1479	1482	1417	1418	1475	1475	1470
31	31	1428	1303	1321	1457	1457	1329	1328	1256	1256	1244
32	32	1293	1451	1457	1266	1267	1418	1422	1445	1444	1431
33	33	1446	1329	1319	1455	1456	1376	1380	1282	1282	1274
34	34	1439	1334	1332	1439	1438	1381	1383	1293	1293	1288
35	35	1435	1336	1325	1458	1455	1382	1386	1291	1291	1289
36	36	1468	1452	1455	1436	1435	1460	1460	670	671	652
37	37	1453	1440	1447	1437	1438	1452	1453	646	647	640
38	38	1455	1433	1444	1423	1423	1448	1449	638	639	635
39	39	1451	1459	1447	1425	1427	1443	1444	654	655	643
40	40	1451	1459	1447	1425	1427	1443	1444	654	655	643
41	41	1479	1445	1445	1455	1458	1444	1445	642	643	645
42	42	1485	1443	1415	1373	1368	1488	1483	1468	1469	1467
43	43	1488	1442	1412	1363	1362	1475	1470	1453	1454	1445
44	44	1508	1436	1419	1407	1404	1488	1483	1473	1472	1462
45	45	1518	1448	1419	1385	1382	1479	1475	1473	1472	1462
46	46	1503	1447	1423	1392	1391	1474	1469	1469	1468	1461
47	47	1510	1443	1420	1387	1383	1475	1471	1466	1465	1454
48	48	1496	1441	1412	1381	1378	1472	1467	1473	1474	1461
49	49	1498	1445	1411	1382	1379	1471	1466	1476	1475	1464
50	50	1494	1442	1407	1385	1382	1471	1466	1477	1476	1468
51	51	1494	1443	1404	1378	1376	1473	1468	1481	1480	1471
52	52	1272	1133	1138	1378	1373	640	647	1450	1451	1450
53	53	1264	1127	1129	1378	1373	652	659	1447	1448	1450

54	54	1448	1443	1449	1309	1304	1460	1461	1446	1446	1462
55	55	1448	1432	1445	1473	1473	1401	1405	1451	1451	1456
56	56	1441	1436	1442	1467	1466	1403	1407	1472	1472	1456
57	57	1443	1447	1448	1471	1472	1399	1403	1462	1462	1464
58	58	1271	1141	1130	1401	1399	597	603	1446	1447	1456
59	59	1497	1466	1457	1445	1446	1473	1474	1487	1487	1475
60	60	1473	1458	1442	1450	1453	1451	1455	696	697	695
61	61	1398	1274	1249	1398	1400	1361	1367	1318	1318	1305
62	62	1407	1278	1252	1384	1389	1385	1390	1329	1329	1319
63	63	1410	1277	1255	1383	1386	1391	1396	1329	1329	1316
64	64	1412	1278	1253	1384	1385	1378	1383	1336	1336	1322
65	65	1408	1283	1256	1390	1393	1387	1392	1339	1339	1325
66	66	1453	1353	1368	1446	1438	1427	1426	1277	1277	1275
67	67	1338	1353	1338	1352	1350	1414	1415	1331	1331	1341
68	68	1487	1474	1480	1466	1467	1473	1471	1449	1449	1435
69	69	1500	1410	1397	1495	1489	1452	1451	1455	1455	1455
70	70	1506	1419	1426	1457	1452	1477	1478	1399	1399	1399
71	71	1469	1451	1443	1451	1449	1435	1436	584	583	567
72	72	1476	1426	1428	1476	1476	1429	1434	1460	1460	1475
73	73	1486	1452	1433	1367	1363	1462	1456	1493	1492	1478
74	74	1480	1446	1455	1371	1371	1467	1461	1494	1495	1478
75	75	1478	1450	1439	1369	1370	1456	1450	1481	1482	1473
76	76	1477	1445	1441	1368	1369	1460	1454	1479	1480	1468
77	77	1452	1456	1446	1394	1393	1466	1460	1475	1475	1459
78	78	1476	1444	1434	1370	1369	1460	1454	1468	1469	1463
79	79	1381	1281	1268	1413	1412	1375	1381	1370	1370	1345
80	80	1460	1424	1418	1442	1441	1452	1454	1229	1230	1235
81	81	1383	1333	1327	1471	1480	1283	1281	1138	1139	1141
82	82	1484	1418	1413	1450	1446	1460	1462	870	871	872
83	83	1445	1340	1352	1434	1433	1305	1306	1174	1175	1170
84	84	1434	1327	1328	1440	1442	1324	1327	1154	1155	1167

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences

Above diagonal: Mean character differences

		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	01	0.72440	0.71285	0.71737	0.71637	0.71737	0.72239	0.72440	0.72641	0.66968	0.71335
2	02	0.72590	0.71536	0.72440	0.72239	0.72490	0.72841	0.72239	0.72741	0.66315	0.71386
3	03	0.72490	0.71034	0.71837	0.71687	0.71888	0.72088	0.71938	0.72540	0.67169	0.71335
4	04	0.72490	0.71586	0.72892	0.72992	0.72892	0.73494	0.72038	0.73243	0.71034	0.71938
5	05	0.72942	0.72540	0.72791	0.72992	0.72741	0.75301	0.74900	0.71486	0.72691	0.74699
6	06	0.71837	0.71285	0.72038	0.71837	0.72038	0.72691	0.73243	0.72289	0.66817	0.71837
7	07	0.72841	0.73394	0.73494	0.73544	0.73544	0.74197	0.72741	0.71185	0.74799	0.71185
8	08	0.72189	0.71737	0.71837	0.71637	0.71888	0.73494	0.72942	0.73394	0.69478	0.72691
9	09	0.71938	0.71235	0.71938	0.71737	0.71938	0.72741	0.73394	0.72239	0.67319	0.71637
10	10	0.71837	0.71436	0.71787	0.71586	0.71837	0.72490	0.73293	0.72038	0.66867	0.71436
11	11	0.74548	0.73645	0.74297	0.74197	0.74247	0.74096	0.75904	0.72791	0.71335	0.74398
12	12	0.72540	0.72590	0.73795	0.73645	0.73896	0.73092	0.72139	0.72590	0.66215	0.71586
13	13	0.71737	0.71536	0.71938	0.71837	0.72038	0.73645	0.72540	0.72791	0.66215	0.71536
14	14	0.72791	0.72390	0.72641	0.72590	0.72741	0.73896	0.75452	0.71888	0.72841	0.74247
15	15	0.72791	0.72641	0.72641	0.72590	0.72741	0.73896	0.75653	0.71787	0.72691	0.74398
16	16	0.72239	0.71135	0.72691	0.72490	0.72791	0.74849	0.70030	0.73042	0.71335	0.71135
17	17	0.72440	0.70984	0.72791	0.72590	0.72892	0.74699	0.70080	0.73193	0.71436	0.71185
18	18	0.00100	0.35191	0.10090	0.10793	0.09940	0.43273	0.51958	0.74197	0.64508	0.74046
19	19	0.00050	0.35141	0.10040	0.10743	0.09890	0.43223	0.51908	0.74197	0.64458	0.74046
20	20	0.09337	0.34388	0.10643	0.11396	0.10542	0.42219	0.51155	0.73544	0.64106	0.73795
21	21	-	0.35090	0.09990	0.10693	0.09839	0.43173	0.51807	0.74096	0.64458	0.74046
22	22	699	-	0.35843	0.36195	0.35743	0.53363	0.51004	0.73996	0.65763	0.72741
23	23	199	714	-	0.00753	0.00301	0.42671	0.51606	0.73695	0.63102	0.74147
24	24	213	721	15	-	0.01054	0.42620	0.51506	0.73594	0.63203	0.74147
25	25	196	712	6	21	-	0.42570	0.51506	0.73845	0.63353	0.74247
26	26	860	1063	850	849	848	-	0.43976	0.73042	0.68424	0.73544
27	27	1032	1016	1028	1026	1026	876	-	0.74347	0.69428	0.72339
28	28	1476	1474	1468	1466	1471	1455	1481	-	0.73996	0.73042
29	29	1284	1310	1257	1259	1262	1363	1383	1474	-	0.69679
30	30	1475	1449	1477	1477	1479	1465	1441	1455	1388	-
31	31	1255	1260	1242	1244	1243	1339	1354	1440	1164	1416
32	32	1444	1441	1439	1437	1442	1464	1478	1441	1476	1444
33	33	1281	1296	1276	1279	1280	1396	1408	1466	603	1381
34	34	1292	1301	1290	1292	1294	1391	1415	1465	613	1376
35	35	1290	1316	1298	1300	1302	1394	1408	1465	610	1390
36	36	669	977	665	672	663	1073	1189	1463	1276	1472
37	37	647	964	639	649	637	1078	1194	1471	1284	1486
38	38	639	956	635	645	633	1076	1188	1470	1285	1476

39	39	653	968	659	666	657	1086	1196	1476	1292	1471
40	40	653	968	659	666	657	1086	1196	1476	1292	1471
41	41	642	974	652	659	650	1089	1197	1475	1277	1470
42	42	1469	1475	1466	1465	1463	1463	1491	1462	1431	1445
43	43	1454	1474	1448	1447	1445	1455	1486	1473	1427	1430
44	44	1472	1481	1469	1469	1466	1466	1468	1452	1431	1424
45	45	1472	1483	1479	1479	1476	1453	1470	1451	1441	1431
46	46	1468	1494	1470	1470	1467	1452	1471	1463	1430	1431
47	47	1465	1486	1469	1469	1466	1447	1466	1455	1436	1433
48	48	1474	1484	1479	1475	1476	1467	1474	1471	1434	1420
49	49	1475	1482	1476	1472	1473	1467	1472	1473	1432	1416
50	50	1476	1477	1479	1475	1476	1468	1477	1475	1434	1419
51	51	1480	1475	1480	1476	1477	1471	1480	1474	1427	1414
52	52	1452	1402	1467	1462	1469	1463	1377	1479	1360	1434
53	53	1449	1415	1452	1447	1454	1453	1382	1479	1342	1436
54	54	1445	1455	1447	1446	1449	1447	1491	1435	1476	1469
55	55	1451	1463	1470	1465	1471	1487	1443	1460	1408	569
56	56	1472	1477	1458	1455	1460	1491	1446	1454	1401	577
57	57	1462	1472	1463	1460	1464	1499	1448	1470	1383	568
58	58	1446	1426	1463	1461	1466	1467	1399	1466	1395	1433
59	59	1487	1477	1468	1468	1471	1485	1463	1437	1407	1435
60	60	695	968	681	688	679	1118	1146	1447	1261	1451
61	61	1317	1388	1316	1312	1321	1395	1417	1435	1353	1433
62	62	1330	1395	1320	1319	1325	1404	1420	1457	1346	1450
63	63	1330	1392	1319	1318	1324	1406	1423	1455	1352	1451
64	64	1337	1395	1325	1324	1330	1406	1416	1461	1347	1447
65	65	1340	1402	1327	1326	1332	1414	1431	1463	1355	1459
66	66	1277	1364	1277	1279	1279	1362	1386	1464	1327	1437
67	67	1330	1366	1332	1334	1334	1363	1350	1448	1321	1444
68	68	1448	1454	1451	1452	1453	1454	1454	1492	1436	1477
69	69	1454	1441	1436	1432	1438	1431	1407	1484	1366	1476
70	70	1398	1401	1400	1399	1401	1374	1420	1478	1398	1477
71	71	584	938	582	594	579	1049	1175	1492	1301	1448
72	72	1460	1446	1475	1475	1476	1491	1450	1459	1392	629
73	73	1492	1485	1464	1464	1463	1482	1487	1478	1446	1436
74	74	1495	1490	1472	1472	1470	1484	1483	1461	1451	1439
75	75	1482	1487	1464	1465	1461	1485	1488	1469	1450	1435
76	76	1480	1488	1458	1459	1455	1480	1485	1471	1450	1430
77	77	1474	1476	1463	1462	1462	1498	1505	1483	1427	1447
78	78	1469	1481	1457	1457	1455	1479	1480	1458	1444	1427
79	79	1369	1444	1333	1333	1334	1389	1448	1461	1348	1426
80	80	1228	1199	1231	1231	1229	1279	1263	1446	1383	1333
81	81	1139	1105	1140	1141	1139	1267	1150	1473	1332	1428
82	82	869	1077	866	877	864	1207	1258	1462	1308	1470
83	83	1174	1125	1168	1169	1167	1268	1271	1479	1330	1453
84	84	1154	1170	1165	1169	1164	1280	1259	1481	1340	1441

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences
Above diagonal: Mean character differences

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
1	01	0.64558	0.65010	0.67470	0.66817	0.66817	0.71586	0.71586	0.71737	0.70884	0.70884
2	02	0.65110	0.64508	0.68825	0.68624	0.67671	0.72038	0.72189	0.72038	0.72440	0.72440
3	03	0.65110	0.64357	0.67671	0.66717	0.66767	0.71586	0.71586	0.71687	0.70984	0.70984
4	04	0.69629	0.73293	0.70281	0.70382	0.69880	0.71938	0.72088	0.71536	0.71536	0.71536
5	05	0.73695	0.63454	0.72490	0.72139	0.72540	0.73494	0.72741	0.72791	0.72490	0.72490
6	06	0.64759	0.63906	0.67922	0.67219	0.67219	0.71386	0.71536	0.71235	0.70833	0.70833
7	07	0.72841	0.70934	0.73896	0.73695	0.73845	0.71737	0.72088	0.71837	0.71737	0.71737
8	08	0.69378	0.72741	0.70131	0.69478	0.69177	0.71285	0.71988	0.71436	0.70833	0.70833
9	09	0.64659	0.63554	0.68223	0.67369	0.66968	0.71536	0.71436	0.71386	0.71185	0.71185
10	10	0.65110	0.63604	0.67721	0.67118	0.66918	0.71737	0.71486	0.71436	0.71235	0.71235
11	11	0.71687	0.64910	0.72590	0.72239	0.72038	0.73695	0.72942	0.73042	0.72841	0.72841
12	12	0.65412	0.72841	0.66717	0.66968	0.67068	0.72892	0.72289	0.71938	0.73243	0.73243
13	13	0.66315	0.73143	0.66215	0.66867	0.66516	0.73042	0.72641	0.72490	0.72641	0.72641
14	14	0.73143	0.63554	0.73042	0.72239	0.73193	0.72088	0.72139	0.71436	0.71536	0.71536
15	15	0.73143	0.63604	0.73092	0.72189	0.73042	0.72038	0.72189	0.71436	0.71637	0.71637
16	16	0.66717	0.71185	0.69076	0.69327	0.69378	0.73293	0.72892	0.72691	0.72440	0.72440
17	17	0.66667	0.71386	0.69277	0.69428	0.69578	0.73293	0.72942	0.72741	0.72490	0.72490
18	18	0.63052	0.72540	0.64357	0.64910	0.64809	0.33635	0.32430	0.32028	0.32831	0.32831
19	19	0.63052	0.72490	0.64357	0.64910	0.64809	0.33685	0.32480	0.32078	0.32882	0.32882
20	20	0.62450	0.71837	0.63956	0.64659	0.64709	0.32731	0.32129	0.31878	0.32279	0.32279
21	21	0.63002	0.72490	0.64307	0.64859	0.64759	0.33584	0.32480	0.32078	0.32781	0.32781
22	22	0.63253	0.72339	0.65060	0.65311	0.66064	0.49046	0.48394	0.47992	0.48594	0.48594
23	23	0.62349	0.72239	0.64056	0.64759	0.65161	0.33384	0.32078	0.31878	0.33082	0.33082

24	24	0.62450	0.72139	0.64207	0.64859	0.65261	0.33735	0.32580	0.32380	0.33434	0.33434
25	25	0.62400	0.72390	0.64257	0.64960	0.65361	0.33283	0.31978	0.31777	0.32982	0.32982
26	26	0.67219	0.73494	0.70080	0.69829	0.69980	0.53865	0.54116	0.54016	0.54518	0.54518
27	27	0.67972	0.74197	0.70683	0.71034	0.70683	0.59689	0.59940	0.59639	0.60040	0.60040
28	28	0.72289	0.72339	0.73594	0.73544	0.73544	0.73444	0.73845	0.73795	0.74096	0.74096
29	29	0.58434	0.74096	0.30271	0.30773	0.30622	0.64056	0.64458	0.64508	0.64859	0.64859
30	30	0.71084	0.72490	0.69327	0.69076	0.69779	0.73896	0.74598	0.74096	0.73845	0.73845
31	31	-	0.71938	0.59237	0.59739	0.58534	0.62400	0.61998	0.62149	0.62500	0.62500
32	32	1433	-	0.74096	0.74297	0.73896	0.72239	0.72339	0.72239	0.72440	0.72440
33	33	1180	1476	-	0.12550	0.12299	0.65010	0.64257	0.64257	0.64508	0.64508
34	34	1190	1480	250	-	0.10793	0.65863	0.65713	0.65663	0.65060	0.65060
35	35	1166	1472	245	215	-	0.65311	0.64558	0.64809	0.64408	0.64408
36	36	1243	1439	1295	1312	1301	-	0.10693	0.10894	0.12249	0.12249
37	37	1235	1441	1280	1309	1286	213	-	0.03263	0.10442	0.10442
38	38	1238	1439	1280	1308	1291	217	65	-	0.07882	0.07882
39	39	1245	1443	1285	1296	1283	244	208	157	-	0.00000
40	40	1245	1443	1285	1296	1283	244	208	157	0	-
41	41	1213	1431	1296	1317	1294	674	682	675	682	682
42	42	1481	1476	1445	1438	1438	1463	1450	1454	1451	1451
43	43	1470	1471	1435	1432	1438	1457	1453	1455	1449	1449
44	44	1461	1462	1437	1439	1445	1467	1463	1459	1460	1460
45	45	1472	1466	1443	1453	1455	1460	1458	1455	1447	1447
46	46	1467	1464	1435	1437	1443	1459	1455	1452	1447	1447
47	47	1472	1465	1443	1453	1455	1460	1457	1454	1447	1447
48	48	1463	1461	1432	1440	1441	1457	1456	1453	1452	1452
49	49	1460	1458	1431	1438	1439	1459	1456	1457	1456	1456
50	50	1457	1463	1437	1440	1440	1457	1455	1456	1455	1455
51	51	1461	1459	1425	1431	1428	1465	1463	1464	1465	1465
52	52	1342	1442	1371	1374	1393	1457	1453	1454	1463	1463
53	53	1354	1437	1350	1357	1376	1448	1446	1450	1464	1464
54	54	1424	1455	1467	1459	1460	1427	1442	1435	1425	1425
55	55	1419	1416	1379	1376	1392	1463	1476	1470	1476	1476
56	56	1415	1410	1383	1382	1388	1451	1466	1464	1459	1459
57	57	1425	1415	1377	1373	1388	1451	1472	1466	1460	1460
58	58	1352	1432	1385	1388	1387	1453	1459	1463	1460	1460
59	59	1491	1462	1445	1439	1436	1466	1470	1473	1461	1461
60	60	1212	1433	1290	1283	1285	697	682	682	676	676
61	61	1350	1421	1382	1380	1355	1302	1321	1311	1307	1307
62	62	1343	1423	1378	1366	1356	1297	1316	1312	1311	1311
63	63	1344	1418	1378	1367	1351	1302	1323	1321	1309	1309
64	64	1342	1416	1375	1364	1346	1308	1324	1322	1317	1317
65	65	1343	1426	1384	1371	1355	1308	1331	1327	1314	1314
66	66	1167	1442	1345	1326	1337	1247	1238	1244	1239	1239
67	67	1162	1242	1348	1333	1352	1337	1344	1348	1333	1333
68	68	1398	1457	1470	1458	1458	1448	1442	1443	1440	1440
69	69	1282	1472	1401	1414	1414	1452	1462	1460	1445	1445
70	70	1318	1461	1405	1409	1401	1404	1383	1389	1387	1387
71	71	1232	1428	1304	1323	1306	668	653	639	642	642
72	72	1443	1477	1395	1383	1394	1489	1492	1481	1478	1478
73	73	1475	1450	1465	1455	1461	1458	1469	1467	1485	1485
74	74	1477	1448	1462	1474	1466	1456	1463	1467	1475	1475
75	75	1484	1450	1471	1469	1471	1458	1454	1456	1469	1469
76	76	1482	1452	1473	1470	1474	1453	1450	1451	1464	1464
77	77	1485	1451	1448	1453	1453	1457	1462	1456	1472	1472
78	78	1481	1446	1455	1459	1458	1450	1458	1450	1461	1461
79	79	1352	1414	1359	1355	1356	1330	1339	1340	1340	1340
80	80	1374	1472	1388	1400	1394	1190	1197	1187	1181	1181
81	81	1324	1425	1340	1333	1332	1139	1150	1138	1131	1131
82	82	1252	1458	1334	1337	1329	873	856	848	864	864
83	83	1226	1454	1341	1353	1346	1137	1126	1136	1132	1132
84	84	1246	1447	1347	1341	1336	1145	1146	1143	1132	1132

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences

Above diagonal: Mean character differences

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
1	01	0.72189	0.73293	0.73193	0.73745	0.73745	0.73092	0.73394	0.73092	0.72992	0.72741
2	02	0.72791	0.72590	0.72942	0.73444	0.72992	0.72590	0.72942	0.72390	0.72239	0.72239
3	03	0.72490	0.73293	0.72841	0.73544	0.73494	0.72892	0.73243	0.72641	0.72440	0.72339
4	04	0.72791	0.72038	0.71888	0.72892	0.71687	0.71737	0.71888	0.72490	0.72641	0.72841
5	05	0.73845	0.72942	0.73293	0.73745	0.74247	0.73845	0.73845	0.73092	0.73243	0.73193
6	06	0.72590	0.72590	0.72892	0.73544	0.73544	0.72490	0.73243	0.72440	0.72490	0.72289
7	07	0.73193	0.74147	0.73896	0.72691	0.73293	0.73092	0.73444	0.73193	0.72992	0.73394
8	08	0.72440	0.73042	0.72540	0.72590	0.72942	0.72390	0.72590	0.72741	0.72791	0.72289

9	09	0.72590	0.73092	0.73143	0.73896	0.73745	0.72892	0.73594	0.72942	0.72992	0.72841
10	10	0.72390	0.73594	0.73494	0.74046	0.74498	0.73394	0.74147	0.73444	0.73494	0.73293
11	11	0.74247	0.74548	0.74699	0.75703	0.76205	0.75452	0.75803	0.75100	0.75201	0.75000
12	12	0.72540	0.72440	0.72390	0.72088	0.72691	0.72641	0.72440	0.72339	0.72540	0.72390
13	13	0.72540	0.71034	0.70884	0.71235	0.71235	0.71436	0.71285	0.70884	0.70833	0.70633
14	14	0.73042	0.68926	0.68424	0.70633	0.69528	0.69880	0.69629	0.69327	0.69378	0.69528
15	15	0.73193	0.68675	0.68373	0.70482	0.69378	0.69829	0.69428	0.69177	0.69227	0.69378
16	16	0.72490	0.74699	0.74046	0.74699	0.74247	0.73996	0.74046	0.73896	0.73845	0.73845
17	17	0.72540	0.74448	0.73795	0.74448	0.74046	0.73745	0.73845	0.73645	0.73594	0.73594
18	18	0.32229	0.73695	0.72942	0.73946	0.73946	0.73745	0.73594	0.73946	0.74096	0.74147
19	19	0.32279	0.73745	0.72992	0.73896	0.73896	0.73695	0.73544	0.73996	0.74046	0.74096
20	20	0.32380	0.73645	0.72540	0.73394	0.73394	0.73343	0.72992	0.73343	0.73494	0.73695
21	21	0.32229	0.73745	0.72992	0.73896	0.73896	0.73695	0.73544	0.73996	0.74046	0.74096
22	22	0.48896	0.74046	0.73996	0.74347	0.74448	0.75000	0.74598	0.74498	0.74398	0.74147
23	23	0.32731	0.73594	0.72691	0.73745	0.74247	0.73795	0.73745	0.74247	0.74096	0.74247
24	24	0.33082	0.73544	0.72641	0.73745	0.74247	0.73795	0.73745	0.74046	0.73896	0.74046
25	25	0.32631	0.73444	0.72540	0.73594	0.74096	0.73645	0.73594	0.74096	0.73946	0.74096
26	26	0.54669	0.73444	0.73042	0.73594	0.72942	0.72892	0.72641	0.73645	0.73645	0.73695
27	27	0.60090	0.74849	0.74598	0.73695	0.73795	0.73845	0.73594	0.73996	0.73896	0.74147
28	28	0.74046	0.73394	0.73946	0.72892	0.72841	0.73444	0.73042	0.73845	0.73946	0.74046
29	29	0.64106	0.71837	0.71637	0.71837	0.72339	0.71787	0.72088	0.71988	0.71888	0.71988
30	30	0.73795	0.72540	0.71787	0.71486	0.71837	0.71837	0.71938	0.71285	0.71084	0.71235
31	31	0.60894	0.74347	0.73795	0.73343	0.73896	0.73645	0.73896	0.73444	0.73293	0.73143
32	32	0.71837	0.74096	0.73845	0.73394	0.73594	0.73494	0.73544	0.73343	0.73193	0.73444
33	33	0.65060	0.72540	0.72038	0.72139	0.72440	0.72038	0.72440	0.71888	0.71837	0.72139
34	34	0.66114	0.72189	0.71888	0.72239	0.72942	0.72139	0.72942	0.72289	0.72189	0.72289
35	35	0.64960	0.72189	0.72189	0.72540	0.73042	0.72440	0.73042	0.72339	0.72239	0.72289
36	36	0.33835	0.73444	0.73143	0.73645	0.73293	0.73243	0.73293	0.73143	0.73243	0.73143
37	37	0.34237	0.72791	0.72942	0.73444	0.73193	0.73042	0.73143	0.73092	0.73092	0.73042
38	38	0.33886	0.72992	0.73042	0.73243	0.73042	0.72892	0.72992	0.72942	0.73143	0.73092
39	39	0.34237	0.72841	0.72741	0.73293	0.72641	0.72641	0.72641	0.72892	0.73092	0.73042
40	40	0.34237	0.72841	0.72741	0.73293	0.72641	0.72641	0.72641	0.72892	0.73092	0.73042
41	41	-	0.72992	0.73243	0.73896	0.72992	0.72992	0.72841	0.73193	0.73092	0.73143
42	42	1454	-	0.10241	0.19026	0.13504	0.13454	0.12048	0.12500	0.12400	0.14608
43	43	1459	204	-	0.19578	0.13906	0.13404	0.12349	0.13002	0.13102	0.14307
44	44	1472	379	390	-	0.12199	0.14859	0.11948	0.12450	0.12349	0.14357
45	45	1454	269	277	243	-	0.07530	0.01757	0.07932	0.07932	0.09990
46	46	1454	268	267	296	150	-	0.05873	0.07982	0.08032	0.10191
47	47	1451	240	246	238	35	117	-	0.06627	0.06627	0.08785
48	48	1458	249	259	248	158	159	132	-	0.00653	0.04016
49	49	1456	247	261	246	158	160	132	13	-	0.03363
50	50	1457	291	285	286	199	203	175	80	67	-
51	51	1455	263	300	259	207	237	201	101	92	127
52	52	1455	1479	1461	1466	1467	1473	1462	1464	1466	1469
53	53	1443	1484	1472	1481	1478	1482	1474	1479	1480	1488
54	54	1420	1358	1337	1374	1351	1342	1351	1349	1345	1346
55	55	1465	1448	1427	1467	1457	1457	1456	1446	1445	1448
56	56	1474	1470	1432	1461	1460	1464	1464	1454	1452	1447
57	57	1464	1487	1452	1472	1474	1472	1472	1464	1461	1459
58	58	1477	1487	1491	1467	1486	1488	1488	1480	1479	1474
59	59	1476	1389	1388	1377	1381	1382	1380	1384	1383	1383
60	60	711	1436	1437	1460	1448	1438	1447	1458	1454	1460
61	61	1299	1474	1462	1481	1469	1471	1467	1464	1466	1474
62	62	1314	1468	1469	1468	1462	1469	1461	1458	1454	1467
63	63	1322	1473	1472	1474	1465	1473	1464	1463	1459	1472
64	64	1324	1469	1467	1470	1463	1472	1463	1459	1455	1468
65	65	1328	1476	1473	1473	1464	1472	1463	1462	1460	1473
66	66	1251	1414	1437	1430	1423	1405	1416	1425	1425	1424
67	67	1347	1414	1444	1435	1440	1438	1437	1435	1432	1432
68	68	1431	1464	1458	1475	1464	1465	1467	1472	1473	1480
69	69	1420	1488	1513	1498	1498	1504	1502	1505	1505	1509
70	70	1401	1456	1465	1465	1459	1461	1459	1461	1460	1473
71	71	639	1455	1453	1464	1472	1459	1467	1466	1465	1465
72	72	1472	1416	1418	1419	1417	1414	1415	1397	1399	1399
73	73	1484	668	681	751	701	730	701	686	685	709
74	74	1484	673	680	765	717	738	716	694	695	721
75	75	1485	706	710	789	745	772	743	726	727	754
76	76	1482	701	705	785	742	769	740	723	724	751
77	77	1481	914	906	1008	970	987	967	949	949	968
78	78	1465	729	728	824	774	798	772	753	754	776
79	79	1351	1485	1471	1481	1503	1495	1499	1487	1485	1497
80	80	1234	1474	1469	1478	1472	1455	1472	1466	1464	1463
81	81	1154	1480	1470	1479	1477	1468	1470	1472	1476	1478
82	82	888	1469	1454	1443	1452	1460	1453	1463	1462	1460
83	83	1147	1449	1451	1448	1453	1451	1449	1453	1457	1457
84	84	1149	1486	1474	1469	1460	1473	1461	1480	1480	1478

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences

Above diagonal: Mean character differences

		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	01	0.73243	0.55522	0.55873	0.71787	0.71988	0.71285	0.71737	0.55823	0.75452	0.72892
2	02	0.72339	0.56175	0.56124	0.71637	0.71084	0.70331	0.71335	0.56576	0.76054	0.73143
3	03	0.72942	0.55321	0.55823	0.71737	0.71386	0.70934	0.71436	0.55974	0.75151	0.73243
4	04	0.72440	0.68624	0.68725	0.73444	0.71436	0.71837	0.72390	0.68725	0.73795	0.71335
5	05	0.72992	0.70984	0.70432	0.73243	0.73092	0.72841	0.73193	0.70482	0.74749	0.73143
6	06	0.72490	0.56426	0.55823	0.72038	0.70884	0.70131	0.70683	0.56627	0.75703	0.72892
7	07	0.73193	0.71586	0.72038	0.74096	0.71436	0.71787	0.71335	0.71637	0.73394	0.71888
8	08	0.72490	0.69629	0.69277	0.73896	0.72440	0.72339	0.73042	0.69127	0.72440	0.71988
9	09	0.72942	0.55622	0.55171	0.72189	0.71185	0.70331	0.71034	0.56526	0.75602	0.72942
10	10	0.73394	0.55622	0.55522	0.71586	0.70733	0.69980	0.70582	0.56325	0.75351	0.72540
11	11	0.75000	0.63855	0.63454	0.72691	0.72691	0.72339	0.72440	0.63805	0.75151	0.73946
12	12	0.72440	0.56878	0.56576	0.72440	0.71888	0.72088	0.72641	0.57279	0.73594	0.73193
13	13	0.70482	0.57129	0.56677	0.72741	0.72540	0.72390	0.72691	0.56727	0.73143	0.72390
14	14	0.69177	0.69177	0.69177	0.65713	0.73946	0.73645	0.73845	0.70331	0.72540	0.72791
15	15	0.69076	0.68926	0.68926	0.65462	0.73946	0.73594	0.73896	0.70231	0.72590	0.72942
16	16	0.73946	0.32129	0.32731	0.73293	0.70331	0.70432	0.70231	0.29970	0.73946	0.72841
17	17	0.73695	0.32480	0.33082	0.73343	0.70532	0.70633	0.70432	0.30271	0.73996	0.73042
18	18	0.74347	0.72791	0.72641	0.72590	0.72841	0.73896	0.73394	0.72590	0.74649	0.34940
19	19	0.74297	0.72841	0.72691	0.72590	0.72841	0.73896	0.73394	0.72641	0.74649	0.34990
20	20	0.73845	0.72791	0.72791	0.73394	0.73092	0.73092	0.73494	0.73092	0.74046	0.34890
21	21	0.74297	0.72892	0.72741	0.72540	0.72841	0.73896	0.73394	0.72590	0.74649	0.34890
22	22	0.74046	0.70382	0.71034	0.73042	0.73444	0.74147	0.73896	0.71586	0.74147	0.48594
23	23	0.74297	0.73645	0.72892	0.72641	0.73795	0.73193	0.73444	0.73444	0.73695	0.34187
24	24	0.74096	0.73394	0.72641	0.72590	0.73544	0.73042	0.73293	0.73343	0.73695	0.34538
25	25	0.74147	0.73745	0.72992	0.72741	0.73845	0.73293	0.73494	0.73594	0.73845	0.34086
26	26	0.73845	0.73444	0.72942	0.72641	0.74649	0.74849	0.75251	0.73645	0.74548	0.56124
27	27	0.74297	0.69127	0.69378	0.74849	0.72440	0.72590	0.72691	0.70231	0.73444	0.57530
28	28	0.73996	0.74247	0.74247	0.72038	0.73293	0.72992	0.73795	0.73594	0.72139	0.72641
29	29	0.71637	0.68273	0.67369	0.74096	0.70683	0.70331	0.69428	0.70030	0.70633	0.63303
30	30	0.70984	0.71988	0.72088	0.73745	0.28564	0.28966	0.28514	0.71938	0.72038	0.72841
31	31	0.73343	0.67369	0.67972	0.71486	0.71235	0.71034	0.71536	0.67871	0.74849	0.60843
32	32	0.73243	0.72390	0.72139	0.73042	0.71084	0.70783	0.71034	0.71888	0.73394	0.71938
33	33	0.71536	0.68825	0.67771	0.73645	0.69227	0.69428	0.69127	0.69528	0.72540	0.64759
34	34	0.71837	0.68976	0.68122	0.73243	0.69076	0.69378	0.68926	0.69679	0.72239	0.64408
35	35	0.71687	0.69930	0.69076	0.73293	0.69880	0.69679	0.69679	0.69629	0.72088	0.64508
36	36	0.73544	0.73143	0.72691	0.71637	0.73444	0.72841	0.72841	0.72942	0.73594	0.34990
37	37	0.73444	0.72942	0.72590	0.72390	0.74096	0.73594	0.73896	0.73243	0.73795	0.34237
38	38	0.73494	0.72992	0.72791	0.72038	0.73795	0.73494	0.73594	0.73444	0.73946	0.34237
39	39	0.73544	0.73444	0.73494	0.71536	0.74096	0.73243	0.73293	0.73293	0.73343	0.33936
40	40	0.73544	0.73444	0.73494	0.71536	0.74096	0.73243	0.73293	0.73293	0.73343	0.33936
41	41	0.73042	0.73042	0.72440	0.71285	0.73544	0.73996	0.73494	0.74147	0.74096	0.35693
42	42	0.13203	0.74247	0.74498	0.68173	0.72691	0.73795	0.74649	0.74649	0.69729	0.72088
43	43	0.15060	0.73343	0.73896	0.67118	0.71637	0.71888	0.72892	0.74849	0.69679	0.72139
44	44	0.13002	0.73594	0.74347	0.68976	0.73645	0.73343	0.73896	0.73645	0.69127	0.73293
45	45	0.10392	0.73645	0.74197	0.67821	0.73143	0.73293	0.73996	0.74598	0.69327	0.72691
46	46	0.11898	0.73946	0.74398	0.67369	0.73143	0.73494	0.73896	0.74699	0.69378	0.72189
47	47	0.10090	0.73394	0.73996	0.67821	0.73092	0.73494	0.73896	0.74699	0.69277	0.72641
48	48	0.05070	0.73494	0.74247	0.67721	0.72590	0.72992	0.73494	0.74297	0.69478	0.73193
49	49	0.04618	0.73594	0.74297	0.67520	0.72540	0.72892	0.73343	0.74247	0.69428	0.72992
50	50	0.06376	0.73745	0.74699	0.67570	0.72691	0.72641	0.73243	0.73996	0.69428	0.73293
51	51	-	0.73795	0.74347	0.67620	0.72540	0.73143	0.73795	0.73594	0.69127	0.73343
52	52	1470	-	0.08484	0.72741	0.70633	0.70884	0.71185	0.30974	0.74347	0.73594
53	53	1481	169	-	0.72992	0.70582	0.70884	0.70934	0.31275	0.74448	0.72942
54	54	1347	1449	1454	-	0.73193	0.73143	0.73293	0.73193	0.73444	0.73243
55	55	1445	1407	1406	1458	-	0.10592	0.09287	0.70783	0.72641	0.73343
56	56	1457	1412	1412	1457	211	-	0.08534	0.70331	0.73143	0.72942
57	57	1470	1418	1413	1460	185	170	-	0.70382	0.72741	0.72892
58	58	1466	617	623	1458	1410	1401	1402	-	0.73343	0.74347
59	59	1377	1481	1483	1463	1447	1457	1449	1461	-	0.74598
60	60	1461	1466	1453	1459	1461	1453	1452	1481	1486	-
61	61	1466	1342	1344	1456	1439	1445	1440	1368	1449	1313
62	62	1456	1347	1341	1462	1449	1467	1453	1384	1452	1317
63	63	1460	1351	1338	1457	1454	1466	1460	1386	1447	1320
64	64	1459	1339	1330	1457	1454	1466	1460	1382	1453	1315
65	65	1461	1355	1342	1463	1465	1475	1469	1393	1444	1326
66	66	1427	1423	1401	1454	1445	1436	1440	1415	1477	1262
67	67	1431	1411	1412	1438	1437	1434	1435	1434	1474	1346
68	68	1474	1520	1509	1454	1476	1485	1461	1467	1450	1466
69	69	1500	1447	1444	1441	1493	1471	1485	1424	1445	1462

70	70	1466	1473	1466	1419	1481	1489	1486	1461	1482	1398
71	71	1474	1459	1446	1425	1470	1452	1457	1459	1476	667
72	72	1397	1421	1434	1504	634	639	629	1407	1438	1465
73	73	691	1470	1476	1368	1453	1459	1457	1444	1388	1456
74	74	697	1470	1478	1361	1441	1449	1448	1454	1380	1459
75	75	733	1460	1466	1373	1437	1451	1442	1449	1411	1460
76	76	728	1463	1468	1377	1434	1452	1443	1452	1404	1457
77	77	954	1454	1461	1374	1419	1425	1428	1443	1436	1468
78	78	754	1462	1460	1358	1420	1431	1438	1440	1425	1461
79	79	1485	1362	1355	1471	1444	1452	1453	1384	1467	1338
80	80	1476	1444	1435	1455	1344	1330	1329	1442	1425	1097
81	81	1472	1275	1271	1448	1442	1449	1437	1304	1456	1162
82	82	1457	1446	1442	1446	1465	1451	1451	1466	1453	853
83	83	1456	1308	1314	1413	1453	1454	1466	1325	1468	1176
84	84	1475	1337	1336	1417	1443	1448	1449	1335	1467	1153

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences

Above diagonal: Mean character differences

		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
1	01	0.64659	0.64307	0.64307	0.64257	0.64759	0.68876	0.61898	0.74849	0.71938	0.71135
2	02	0.63805	0.65010	0.64809	0.65010	0.65060	0.69327	0.61898	0.73996	0.71938	0.72440
3	03	0.64106	0.63956	0.63755	0.63755	0.64257	0.69026	0.61898	0.74398	0.72239	0.71235
4	04	0.66616	0.66867	0.66918	0.67118	0.66918	0.70080	0.70030	0.74699	0.72540	0.73042
5	05	0.69076	0.69679	0.69779	0.69980	0.69679	0.71737	0.65813	0.74448	0.74699	0.74147
6	06	0.64207	0.64960	0.64709	0.64859	0.65161	0.68574	0.61948	0.74147	0.72691	0.71386
7	07	0.73795	0.72641	0.73193	0.73042	0.73745	0.72942	0.72641	0.74448	0.75853	0.72741
8	08	0.63253	0.63906	0.63604	0.63353	0.64056	0.69127	0.70432	0.74649	0.71888	0.72641
9	09	0.63755	0.64257	0.64106	0.64257	0.64558	0.68624	0.62299	0.73845	0.73092	0.71436
10	10	0.64006	0.64558	0.64408	0.64558	0.64859	0.68725	0.62098	0.73594	0.72791	0.71335
11	11	0.70181	0.70633	0.70783	0.70884	0.70683	0.72942	0.67169	0.74649	0.75301	0.75602
12	12	0.63956	0.64157	0.64106	0.64157	0.64408	0.67922	0.67922	0.73996	0.70783	0.71235
13	13	0.62701	0.62851	0.63002	0.62902	0.63052	0.68675	0.67169	0.74297	0.70131	0.71586
14	14	0.70181	0.69478	0.69428	0.69478	0.69779	0.72590	0.67871	0.73594	0.75050	0.73143
15	15	0.70281	0.69729	0.69578	0.69528	0.69930	0.72189	0.67771	0.73645	0.74749	0.72892
16	16	0.68323	0.69528	0.69829	0.69177	0.69629	0.71637	0.70984	0.73946	0.72892	0.74147
17	17	0.68624	0.69779	0.70080	0.69428	0.69880	0.71586	0.71034	0.73845	0.72841	0.74197
18	18	0.66165	0.66717	0.66717	0.67068	0.67219	0.64106	0.66817	0.72741	0.73042	0.70231
19	19	0.66165	0.66717	0.66717	0.67068	0.67219	0.64106	0.66817	0.72741	0.73042	0.70231
20	20	0.65512	0.66215	0.66064	0.66365	0.66516	0.64006	0.67319	0.72038	0.73042	0.70231
21	21	0.66114	0.66767	0.66767	0.67118	0.67269	0.64106	0.66767	0.72691	0.72992	0.70181
22	22	0.69679	0.70030	0.69880	0.70030	0.70382	0.68474	0.68574	0.72992	0.72339	0.70331
23	23	0.66064	0.66265	0.66215	0.66516	0.66616	0.64106	0.66867	0.72841	0.72088	0.70281
24	24	0.65863	0.66215	0.66165	0.66466	0.66566	0.64207	0.66968	0.72892	0.71888	0.70231
25	25	0.66315	0.66516	0.66466	0.66767	0.66867	0.64207	0.66968	0.72942	0.72189	0.70331
26	26	0.70030	0.70482	0.70582	0.70582	0.70984	0.68373	0.68424	0.72992	0.71837	0.68976
27	27	0.71135	0.71285	0.71436	0.71084	0.71837	0.69578	0.67771	0.72992	0.70633	0.71285
28	28	0.72038	0.73143	0.73042	0.73343	0.73444	0.73494	0.72691	0.74900	0.74498	0.74197
29	29	0.67922	0.67570	0.67871	0.67620	0.68022	0.66616	0.66315	0.72088	0.68574	0.70181
30	30	0.71938	0.72791	0.72841	0.72641	0.73243	0.72139	0.72490	0.74147	0.74096	0.74147
31	31	0.67771	0.67420	0.67470	0.67369	0.67420	0.58584	0.58333	0.70181	0.64357	0.66165
32	32	0.71335	0.71436	0.71185	0.71084	0.71586	0.72390	0.62349	0.73143	0.73896	0.73343
33	33	0.69378	0.69177	0.69177	0.69026	0.69478	0.67520	0.67671	0.73795	0.70331	0.70532
34	34	0.69277	0.68574	0.68624	0.68474	0.68825	0.66566	0.66918	0.73193	0.70984	0.70733
35	35	0.68022	0.68072	0.67821	0.67570	0.68022	0.67118	0.67871	0.73193	0.70984	0.70331
36	36	0.65361	0.65110	0.65361	0.65663	0.65663	0.62600	0.67118	0.72691	0.72892	0.70482
37	37	0.66315	0.66064	0.66416	0.66466	0.66817	0.62149	0.67470	0.72390	0.73394	0.69428
38	38	0.65813	0.65863	0.66315	0.66365	0.66616	0.62450	0.67671	0.72440	0.73293	0.69729
39	39	0.65612	0.65813	0.65713	0.66114	0.65964	0.62199	0.66918	0.72289	0.72540	0.69629
40	40	0.65612	0.65813	0.65713	0.66114	0.65964	0.62199	0.66918	0.72289	0.72540	0.69629
41	41	0.65211	0.65964	0.66365	0.66466	0.66667	0.62801	0.67620	0.71837	0.71285	0.70331
42	42	0.73996	0.73695	0.73946	0.73745	0.74096	0.70984	0.70984	0.73494	0.74699	0.73092
43	43	0.73394	0.73745	0.73896	0.73645	0.73946	0.72139	0.72490	0.73193	0.75954	0.73544
44	44	0.74347	0.73695	0.73996	0.73795	0.73946	0.71787	0.72038	0.74046	0.75201	0.73544
45	45	0.73745	0.73394	0.73544	0.73444	0.73494	0.71436	0.72289	0.73494	0.75201	0.73243
46	46	0.73845	0.73745	0.73946	0.73896	0.73896	0.70532	0.72189	0.73544	0.75502	0.73343
47	47	0.73645	0.73343	0.73494	0.73444	0.73444	0.71084	0.72139	0.73645	0.75402	0.73243
48	48	0.73494	0.73193	0.73444	0.73243	0.73394	0.71536	0.72038	0.73896	0.75552	0.73343
49	49	0.73594	0.72992	0.73243	0.73042	0.73293	0.71536	0.71888	0.73946	0.75552	0.73293
50	50	0.73996	0.73645	0.73896	0.73695	0.73946	0.71486	0.71888	0.74297	0.75753	0.73946
51	51	0.73594	0.73092	0.73293	0.73243	0.73343	0.71637	0.71837	0.73996	0.75301	0.73594
52	52	0.67369	0.67620	0.67821	0.67219	0.68022	0.71436	0.70833	0.76305	0.72641	0.73946
53	53	0.67470	0.67319	0.67169	0.66767	0.67369	0.70331	0.70884	0.75753	0.72490	0.73594
54	54	0.73092	0.73394	0.73143	0.73143	0.73444	0.72992	0.72189	0.72992	0.72339	0.71235

55	55	0.72239	0.72741	0.72992	0.72992	0.73544	0.72540	0.72139	0.74096	0.74950	0.74347
56	56	0.72540	0.73645	0.73594	0.73594	0.74046	0.72088	0.71988	0.74548	0.73845	0.74749
57	57	0.72289	0.72942	0.73293	0.73293	0.73745	0.72289	0.72038	0.73343	0.74548	0.74598
58	58	0.68675	0.69478	0.69578	0.69378	0.69930	0.71034	0.71988	0.73645	0.71486	0.73343
59	59	0.72741	0.72892	0.72641	0.72942	0.72490	0.74147	0.73996	0.72791	0.72540	0.74398
60	60	0.65914	0.66114	0.66265	0.66014	0.66566	0.63353	0.67570	0.73594	0.73394	0.70181
61	61	-	0.12199	0.12098	0.12400	0.12801	0.66918	0.67821	0.74950	0.70382	0.70783
62	62	243	-	0.02209	0.02610	0.03213	0.66114	0.67620	0.75000	0.70934	0.70884
63	63	241	44	-	0.01908	0.01205	0.66215	0.67269	0.75050	0.70331	0.70884
64	64	247	52	38	-	0.02510	0.66165	0.67269	0.74749	0.70231	0.70934
65	65	255	64	24	50	-	0.66114	0.67169	0.75050	0.70281	0.71084
66	66	1333	1317	1319	1318	1317	-	0.46888	0.68273	0.63052	0.63253
67	67	1351	1347	1340	1340	1338	934	-	0.67922	0.63906	0.63504
68	68	1493	1494	1495	1489	1495	1360	1353	-	0.61546	0.66315
69	69	1402	1413	1401	1399	1400	1256	1273	1226	-	0.67871
70	70	1410	1412	1412	1413	1416	1260	1265	1321	1352	-
71	71	1337	1330	1329	1329	1333	1273	1351	1459	1446	1409
72	72	1431	1447	1450	1447	1454	1448	1480	1482	1470	1476
73	73	1486	1486	1483	1485	1476	1456	1457	1494	1504	1480
74	74	1477	1475	1472	1476	1467	1439	1437	1491	1499	1464
75	75	1479	1473	1474	1476	1473	1450	1454	1486	1512	1488
76	76	1476	1470	1471	1473	1471	1448	1454	1484	1505	1486
77	77	1478	1476	1475	1478	1476	1442	1451	1456	1509	1489
78	78	1489	1492	1492	1492	1494	1448	1454	1477	1487	1496
79	79	602	590	594	599	598	1313	1336	1495	1415	1433
80	80	1427	1410	1414	1413	1421	1276	1356	1473	1439	1399
81	81	1427	1415	1430	1428	1436	1369	1338	1414	1470	1395
82	82	1352	1340	1340	1342	1343	1288	1367	1451	1464	1399
83	83	1411	1401	1405	1403	1407	1376	1375	1460	1446	1369
84	84	1432	1429	1429	1428	1433	1317	1394	1427	1461	1366

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences

Above diagonal: Mean character differences

	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
1	01	0.71737	0.71938	0.73293	0.74046	0.73745	0.73695	0.73544	0.73695	0.63153	0.71034
2	02	0.72289	0.71586	0.75954	0.74950	0.75351	0.75151	0.74398	0.74900	0.63203	0.71436
3	03	0.71536	0.71888	0.73343	0.73996	0.74046	0.73946	0.73695	0.73946	0.62902	0.71436
4	04	0.72590	0.71285	0.70934	0.71335	0.71235	0.71285	0.73293	0.71034	0.66566	0.71737
5	05	0.72942	0.74799	0.73996	0.73645	0.74046	0.74046	0.72641	0.73544	0.69127	0.71837
6	06	0.71486	0.72289	0.73092	0.73695	0.73494	0.73544	0.72540	0.73143	0.63454	0.70532
7	07	0.71185	0.71687	0.72540	0.73092	0.72892	0.72942	0.72691	0.73594	0.72841	0.73494
8	08	0.72038	0.73193	0.72841	0.73795	0.72942	0.73092	0.72139	0.72892	0.64106	0.71185
9	09	0.71737	0.71888	0.73143	0.73544	0.73645	0.73594	0.72841	0.73444	0.63102	0.70984
10	10	0.71285	0.72239	0.73845	0.74046	0.74247	0.74197	0.72942	0.73745	0.63404	0.70683
11	11	0.73745	0.74096	0.74598	0.74297	0.74197	0.74147	0.72892	0.74096	0.62927	0.73293
12	12	0.72841	0.71586	0.72892	0.72590	0.72791	0.72540	0.73092	0.72490	0.64307	0.71486
13	13	0.72440	0.71687	0.71938	0.73042	0.72239	0.72339	0.72590	0.71988	0.63655	0.71185
14	14	0.72841	0.74096	0.68624	0.68825	0.68725	0.68675	0.69980	0.68775	0.70934	0.72390
15	15	0.72741	0.74096	0.68424	0.68825	0.68775	0.68725	0.69930	0.68725	0.70884	0.72339
16	16	0.72038	0.71737	0.73394	0.73645	0.73092	0.73293	0.73594	0.73293	0.69026	0.72892
17	17	0.72088	0.71988	0.73092	0.73343	0.72791	0.72992	0.73293	0.72992	0.69327	0.72992
18	18	0.29317	0.73293	0.74950	0.75000	0.74347	0.74247	0.74046	0.73695	0.68775	0.61697
19	19	0.29267	0.73293	0.74900	0.75050	0.74398	0.74297	0.74046	0.73745	0.68775	0.61747
20	20	0.28464	0.74046	0.74197	0.74197	0.73946	0.73695	0.73243	0.73444	0.67520	0.61998
21	21	0.29317	0.73293	0.74900	0.75050	0.74398	0.74297	0.73996	0.73745	0.68725	0.61647
22	22	0.47088	0.72590	0.74548	0.74799	0.74649	0.74699	0.74096	0.74347	0.72490	0.60191
23	23	0.29217	0.74046	0.73494	0.73896	0.73494	0.73193	0.73444	0.73143	0.66918	0.61797
24	24	0.29819	0.74046	0.73494	0.73896	0.73544	0.73243	0.73394	0.73143	0.66918	0.61797
25	25	0.29066	0.74096	0.73444	0.73795	0.73343	0.73042	0.73394	0.73042	0.66968	0.61697
26	26	0.52661	0.74849	0.74398	0.74498	0.74548	0.74297	0.75201	0.74247	0.69729	0.64207
27	27	0.58986	0.72791	0.74649	0.74448	0.74699	0.74548	0.75552	0.74297	0.72691	0.63404
28	28	0.74900	0.73243	0.74197	0.73343	0.73745	0.73845	0.74448	0.73193	0.73343	0.72590
29	29	0.65311	0.69880	0.72590	0.72841	0.72791	0.72791	0.71637	0.72490	0.67671	0.69428
30	30	0.72691	0.31576	0.72088	0.72239	0.72038	0.71787	0.72641	0.71637	0.71586	0.66918
31	31	0.61847	0.72440	0.74046	0.74147	0.74498	0.74398	0.74548	0.74347	0.67871	0.68976
32	32	0.71687	0.74147	0.72791	0.72691	0.72791	0.72892	0.72841	0.72590	0.70984	0.73896
33	33	0.65462	0.70030	0.73544	0.73394	0.73845	0.73946	0.72691	0.73042	0.68223	0.69679
34	34	0.66416	0.69428	0.73042	0.73996	0.73745	0.73795	0.72942	0.73243	0.68022	0.70281
35	35	0.65562	0.69980	0.73343	0.73594	0.73845	0.73996	0.72942	0.73193	0.68072	0.69980
36	36	0.33534	0.74749	0.73193	0.73092	0.73193	0.72942	0.73143	0.72791	0.66767	0.59739
37	37	0.32781	0.74900	0.73745	0.73444	0.72992	0.72791	0.73394	0.73193	0.67219	0.60090
38	38	0.32078	0.74347	0.73645	0.73645	0.73092	0.72841	0.73092	0.72791	0.67269	0.59588
39	39	0.32229	0.74197	0.74548	0.74046	0.73745	0.73494	0.73896	0.73343	0.67269	0.59287

40	40	0.32229	0.74197	0.74548	0.74046	0.73745	0.73494	0.73896	0.73343	0.67269	0.59287
41	41	0.32078	0.73896	0.74498	0.74498	0.74548	0.74398	0.74347	0.73544	0.67821	0.61948
42	42	0.73042	0.71084	0.33534	0.33785	0.35442	0.35191	0.45884	0.36596	0.74548	0.73996
43	43	0.72942	0.71185	0.34187	0.34137	0.35643	0.35392	0.45482	0.36546	0.73845	0.73745
44	44	0.73494	0.71235	0.37701	0.38404	0.39608	0.39408	0.50602	0.41365	0.74347	0.74197
45	45	0.73896	0.71135	0.35191	0.35994	0.37400	0.37249	0.48695	0.38855	0.75452	0.73896
46	46	0.73243	0.70984	0.36647	0.37048	0.38755	0.38604	0.49548	0.40060	0.75050	0.73042
47	47	0.73645	0.71034	0.35191	0.35944	0.37299	0.37149	0.48544	0.38755	0.75251	0.73896
48	48	0.73594	0.70131	0.34438	0.34839	0.36446	0.36295	0.47641	0.37801	0.74649	0.73594
49	49	0.73544	0.70231	0.34388	0.34890	0.36496	0.36345	0.47641	0.37851	0.74548	0.73494
50	50	0.73544	0.70231	0.35592	0.36195	0.37851	0.37701	0.48594	0.38956	0.75151	0.73444
51	51	0.73996	0.70131	0.34689	0.34990	0.36797	0.36546	0.47892	0.37851	0.74548	0.74096
52	52	0.73243	0.71335	0.73795	0.73795	0.73293	0.73444	0.72992	0.73394	0.68373	0.72490
53	53	0.72590	0.71988	0.74096	0.74197	0.73594	0.73695	0.73343	0.73293	0.68022	0.72038
54	54	0.71536	0.75502	0.68675	0.68323	0.68926	0.69127	0.68976	0.68173	0.73845	0.73042
55	55	0.73795	0.31827	0.72942	0.72339	0.72139	0.71988	0.71235	0.71285	0.72490	0.67470
56	56	0.72892	0.32078	0.73243	0.72741	0.72841	0.72892	0.71536	0.71837	0.72892	0.66767
57	57	0.73143	0.31576	0.73143	0.72691	0.72390	0.72440	0.71687	0.72189	0.72942	0.66717
58	58	0.73243	0.70633	0.72490	0.72992	0.72741	0.72892	0.72440	0.72289	0.69478	0.72390
59	59	0.74096	0.70189	0.69679	0.69277	0.70833	0.70482	0.72088	0.71536	0.73645	0.71536
60	60	0.33484	0.73544	0.73092	0.73243	0.73293	0.73143	0.73695	0.73343	0.67169	0.55070
61	61	0.67118	0.71837	0.74598	0.74147	0.74247	0.74096	0.74197	0.74749	0.30221	0.71637
62	62	0.66767	0.72641	0.74598	0.74046	0.73946	0.73795	0.74096	0.74900	0.29618	0.70783
63	63	0.66717	0.72791	0.74448	0.73896	0.73996	0.73845	0.74046	0.74900	0.29819	0.70984
64	64	0.66717	0.72641	0.74548	0.74096	0.74096	0.73946	0.74197	0.74900	0.30070	0.70934
65	65	0.66918	0.72992	0.74096	0.73645	0.73946	0.73845	0.74096	0.75000	0.30020	0.71335
66	66	0.63906	0.72691	0.73092	0.72239	0.72791	0.72691	0.72390	0.72691	0.65914	0.64056
67	67	0.67821	0.74297	0.73143	0.72139	0.72992	0.72841	0.72992	0.72841	0.72992	0.68072
68	68	0.73243	0.74398	0.75000	0.74849	0.74598	0.74498	0.73092	0.74147	0.75050	0.73946
69	69	0.72590	0.73795	0.75502	0.75251	0.75904	0.75552	0.75753	0.74649	0.71034	0.72239
70	70	0.70733	0.74096	0.74297	0.73494	0.74699	0.74598	0.74749	0.75100	0.71938	0.70231
71	71	-	0.73845	0.73394	0.73343	0.73293	0.73143	0.73444	0.72992	0.68675	0.60392
72	72	1471	-	0.71737	0.72139	0.70934	0.71034	0.71837	0.71486	0.72339	0.67821
73	73	1462	1429	-	0.09940	0.12349	0.12149	0.28614	0.15010	0.73845	0.73394
74	74	1461	1437	198	-	0.10141	0.09789	0.27309	0.13554	0.74398	0.73745
75	75	1460	1413	246	202	-	0.01054	0.23946	0.12199	0.73645	0.73695
76	76	1457	1415	242	195	21	-	0.23745	0.11797	0.73594	0.73594
77	77	1463	1431	570	544	477	473	-	0.24398	0.73394	0.72741
78	78	1454	1424	299	270	243	235	486	-	0.74448	0.73293
79	79	1368	1441	1471	1482	1467	1466	1462	1483	-	0.69930
80	80	1203	1351	1462	1469	1468	1466	1449	1460	1393	-
81	81	1161	1432	1495	1500	1505	1503	1499	1482	1460	1227
82	82	877	1454	1482	1462	1451	1448	1472	1449	1334	1251
83	83	1149	1457	1464	1500	1496	1495	1508	1489	1418	1238
84	84	1144	1442	1499	1493	1498	1498	1506	1493	1433	1255

Pairwise distances between taxa (continued)

Below diagonal: Total character differences
Above diagonal: Mean character differences

	81	82	83	84	
1	01	0.65211	0.71486	0.67871	0.67721
2	02	0.65311	0.72390	0.68072	0.68173
3	03	0.65361	0.71486	0.68173	0.68022
4	04	0.70281	0.72339	0.71737	0.70231
5	05	0.71084	0.74699	0.73996	0.73343
6	06	0.65562	0.71335	0.68022	0.67671
7	07	0.72390	0.71737	0.71787	0.73293
8	08	0.71235	0.71285	0.71135	0.71084
9	09	0.65361	0.71787	0.68323	0.67922
10	10	0.65010	0.71837	0.67871	0.68173
11	11	0.69428	0.74498	0.72540	0.71988
12	12	0.66918	0.71185	0.67269	0.66616
13	13	0.66616	0.70934	0.67871	0.66667
14	14	0.73845	0.72791	0.71988	0.72289
15	15	0.74297	0.72590	0.71938	0.72390
16	16	0.64408	0.73293	0.65512	0.66466
17	17	0.64307	0.73394	0.65562	0.66616
18	18	0.57129	0.43675	0.58936	0.57932
19	19	0.57179	0.43725	0.58986	0.57982
20	20	0.57279	0.43775	0.58735	0.58584
21	21	0.57179	0.43624	0.58936	0.57932
22	22	0.55472	0.54066	0.56476	0.58735
23	23	0.57229	0.43474	0.58635	0.58484
24	24	0.57279	0.44026	0.58685	0.58685

25	25	0.57179	0.43373	0.58584	0.58434
26	26	0.63604	0.60592	0.63655	0.64257
27	27	0.57731	0.63153	0.63805	0.63203
28	28	0.73946	0.73394	0.74247	0.74347
29	29	0.66867	0.65663	0.66767	0.67269
30	30	0.71687	0.73795	0.72942	0.72339
31	31	0.66466	0.62851	0.61546	0.62550
32	32	0.71536	0.73193	0.72992	0.72641
33	33	0.67269	0.66968	0.67319	0.67620
34	34	0.66918	0.67118	0.67922	0.67319
35	35	0.66867	0.66717	0.67570	0.67068
36	36	0.57179	0.43825	0.57078	0.57480
37	37	0.57731	0.42972	0.56526	0.57530
38	38	0.57129	0.42570	0.57028	0.57380
39	39	0.56777	0.43373	0.56827	0.56827
40	40	0.56777	0.43373	0.56827	0.56827
41	41	0.57932	0.44578	0.57580	0.57681
42	42	0.74297	0.73745	0.72741	0.74598
43	43	0.73795	0.72992	0.72841	0.73996
44	44	0.74247	0.72440	0.72691	0.73745
45	45	0.74147	0.72892	0.72942	0.73293
46	46	0.73695	0.73293	0.72841	0.73946
47	47	0.73795	0.72942	0.72741	0.73343
48	48	0.73896	0.73444	0.72942	0.74297
49	49	0.74096	0.73394	0.73143	0.74297
50	50	0.74197	0.73293	0.73143	0.74197
51	51	0.73896	0.73143	0.73092	0.74046
52	52	0.64006	0.72590	0.65663	0.67118
53	53	0.63805	0.72390	0.65964	0.67068
54	54	0.72691	0.72590	0.70934	0.71135
55	55	0.72390	0.73544	0.72942	0.72440
56	56	0.72741	0.72841	0.72992	0.72691
57	57	0.72139	0.72841	0.73594	0.72741
58	58	0.65462	0.73594	0.66516	0.67018
59	59	0.73092	0.72942	0.73695	0.73645
60	60	0.58333	0.42821	0.59036	0.57882
61	61	0.71637	0.67871	0.70833	0.71888
62	62	0.71034	0.67269	0.70331	0.71737
63	63	0.71787	0.67269	0.70532	0.71737
64	64	0.71687	0.67369	0.70432	0.71687
65	65	0.72088	0.67420	0.70633	0.71938
66	66	0.68725	0.64659	0.69076	0.66114
67	67	0.67169	0.68624	0.69026	0.69980
68	68	0.70984	0.72841	0.73293	0.71637
69	69	0.73795	0.73494	0.72590	0.73343
70	70	0.70030	0.70231	0.68725	0.68574
71	71	0.58283	0.44026	0.57681	0.57430
72	72	0.71888	0.72992	0.73143	0.72390
73	73	0.75050	0.74398	0.73494	0.75251
74	74	0.75301	0.73394	0.75301	0.74950
75	75	0.75552	0.72841	0.75100	0.75201
76	76	0.75452	0.72691	0.75050	0.75201
77	77	0.75251	0.73896	0.75703	0.75602
78	78	0.74398	0.72741	0.74749	0.74950
79	79	0.73293	0.66968	0.71185	0.71938
80	80	0.61596	0.62801	0.62149	0.63002
81	81	-	0.57179	0.42369	0.44378
82	82	1139	-	0.56275	0.52610
83	83	844	1121	-	0.41365
84	84	884	1048	824	-

ANEXO 5 – Árvore filogenética

Figura 35 - Árvore obtida sob condições de máxima verossimilhança, a partir da análise das amostras sequenciadas, com as referências para os 28 sorotipos do VLA foi construída utilizando como critério de otimização nas análises filogenéticas, o modelo matemático evolutivo de substituição de nucleotídeo Tamura-Nei + I + G, onde os parâmetros de substituição foram: InL = -121016.0938, valor de I = 0,0040, valor de G = 1,7278 com “bootstrap” de 1000 réplicas. Somente valores acima de 60% foram aceitos.

