



Estudo molecular do ZIKV, BVDV e BTV em ruminantes e sua interação com dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides*

**INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO**

**Estudo molecular do ZIKV, BVDV e BTV em ruminantes e sua
interação com dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides***

FABÍOLA DE SOUZA LEMES DOS SANTOS

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração:
Segurança Alimentar e
Sanidade no Agrossistema

Orientador: Prof. Dra Liria
Hiromi Okuda

São Paulo

2023

Eu **Fabiola de Souza Lemes dos Santos**, 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: Fabiola de Souza Lemes dos Santos Data 10/01/2023

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

Santos, Fabiola de Souza Lemes dos.
Estudo molecular de ZIKV, BVDV e BTV em ruminantes e sua interação com dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides*. / Fabiola de Souza Lemes dos Santos
- São Paulo, 2023.
127 p.
doi: 10.31368/PGSSAAA.2023T.F504

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Saúde no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Saúde, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária.

Orientadora: Liris Hirani Duarte

Versão do título para o inglês: Molecular study of ZIKV, BVDV and BTV in ruminants and their interaction with diptera of the genera *Aedes* and *Culicoides*

1. Arbovirus 2. Vetores 3. Hospedeiros 4. Zika vírus 5. Ruminantes
I. Santos, Fabiola de Souza Lemes dos II. Cuiça, Liris Hirani III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/BIBL/2023/004



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
 DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
 Pós-Graduação
 Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252
 Vila Mariana
 Caixa Postal 12898
 CEP 04010-970 - São Paulo / SP
 secretariagg@biologico.sp.gov.br



Curso Reconhecido de acordo com o disposto na Portaria MEC N° 609 de 14/03/2019 - D.O.U. 18/03/2019

ATA DA SESSÃO PÚBLICA PARA JULGAMENTO DA TESE DE DOUTORADO DE FABIOLA DE SOUZA LEMES DOS SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SANIDADE NO AGROECOSSISTEMA, DO INSTITUTO BIOLÓGICO.

Aos 11 de Julho de 2023 às 14h00min, na pós-graduação da sede do Instituto Biológico, a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profª. Drª. Liria Hiromi Okuda - Instituto Biológico (orientador), Profª. Drª. Edviges Maristela Pituco - PANAFITOSA-OPAS/OMS, Prof. Dr. Antônio Carlos Cruz Macedo - Instituto Biológico, Profª. Drª. Licia Natal Fernandes - Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical - USP, Profª. Drª. Maria Clara Alves Santarem - Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz RJ se reuniu sob a presidência do primeiro a fim de proceder à arguição pública da TESE DE DOUTORADO de Fabiola de Souza Lemes dos Santos, intitulada: "Estudo molecular do ZIKV, BVDV E BTM em ruminantes e sua interação com dípteros dos gêneros Aedes e Culicoides". A sessão pública foi aberta pela Profª. Drª. Liria Hiromi Okuda - Instituto Biológico, na qualidade de Orientadora e Presidenta da Comissão Examinadora, que passou a palavra para a candidata, para exposição oral de seu trabalho, com duração de até 45 minutos. Em seguida, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora que, em sessão secreta, deliberou pela APROVAÇÃO unânime da candidata. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata que, após ser lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profª. Drª. Liria Hiromi Okuda - Instituto Biológico

Profª. Drª. Edviges Maristela Pituco - PANAFITOSA-OPAS/OMS

Prof. Dr. Antônio Carlos Cruz Macedo - Instituto Biológico

Profª. Drª. Licia Natal Fernandes - Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical -USP

Profª. Drª. Maria Clara Alves Santarem - Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz RJ

Documento assinado digitalmente
 LIRIA HIROMI OKUDA
 Data: 2023.07.11 09:54:00
 Verifique em: https://portal.sp.gov

DEDICATÓRIA

A mim, Fabíola de Souza Lemes dos Santos
Pela dádiva do recomeço. Por vencer esta batalha contra o câncer!
Nem tudo são flores, mas tudo é semente. Minha escolha sempre vai ser semear.

OFEREÇO

A todos àqueles que tem coragem de recomeçar!

DEDICO

Vou cantar meus sonhos pra desfazer o pranto do que não valeu
A partir desse instante vou olhar a vida como uma despedida pra uma festa maior
Vou desatar o nó das lembranças perdidas, da tristeza contida de um sofrimento a sós
Eu vou recomeçar como se hoje fosse o primeiro dia do mundo
Não me machucar, nem perder a hora de saber o que será
Vou receber os dias como pedras raras que o vento escondeu
Vou te olhar nos olhos, não se pede desculpas pelo que não foi dito pelo que não doeu
E na casa do tempo vou refazer a história respeitando a glória de quem já sofreu
E tudo é bem menor que a verdade clara deste sentimento a clamar
Que a vida é um bem maior
Seu silêncio cala toda dor que há
Eu vou recomeçar como se hoje fosse o primeiro dia do mundo
Não me machucar nem perder a hora de saber o que será

Flávia Wenceslau

AGRADECIMENTOS

Está terminando mais uma etapa da minha vida profissional, mas ela não poderia terminar sem eu expressar algumas palavras de agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Primeiramente agradeço a Deus pelo bem maior que é a existência.

Agradeço aos meus familiares, companheiros de vida, pelo apoio e incentivo durante todos esses anos e sem o qual eu não seria o que sou hoje. Gratidão em especial aos meus pais, Waldemar e Marly, por todo o exemplo de vida.

Agradeço aos meus filhos Bernardo e Nathan, por serem minha maior motivação.

Agradeço ao meu marido Wagner. Muito obrigada por estar ao meu lado na alegria e na tristeza, na saúde e na doença.

Agradeço a Dra. Liria Okuda por ter-me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho, ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho, sem nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem. Pela forma amiga e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, e pelo estímulo sentido após cada conversa, que me faziam “recarregar baterias”.

Agradeço a todos integrantes do Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo – Adriana, Marcia, Marta Vicenti, Taís Ávila, Alisete Assumpção, Mariana, Regina Paixão, Raquel, Abraão e Eliana De Stefano. Fazer parte desta equipe de trabalho foi uma verdadeira honra e não me arrependi em nenhum momento de ter passado por aqui.

Agradeço a Dra Claudia Del Fava por tornar possível o início dessa jornada.

Agradeço aos colegas de pesquisa, Solange Oliveira, Bianca Freire, Daniela, Hélio pela grande parceria durante o projeto e por tornarem possível sua realização.

Aos colegas, Priscilla Felício, Alexandre e Luara pelos bons momentos de descontração.

A Dra Marcia Catroxo por ser a minha primeira orientadora e por me mostrar os primeiros passos da pesquisa científica. Agradeço também o incentivo e os valiosos ensinamentos.

À toda equipe do Laboratório de Diptera do Instituto Oswaldo Cruz, em especial a Dra. Maria Clara Alves Santarém e a Dra Maria Luiza Felipe-Bauer, que contribuíram com a identificação dos *Culicoides*.

À toda equipe do Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo, Itália, pela contribuição com a identificação dos *Culicoides* e análise molecular.

A todos os profissionais 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.

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

Aos membros da banca examinadora de qualificação e defesa pela valiosa contribuição, revisão e discussão científica.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelas considerações citadas que agregaram ao trabalho realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

O sentimento de dever cumprido e meu crescimento pessoal e profissional, provam que valeu a pena a etapa que agora termina. Meus sinceros agradecimentos!

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

SOUZA, Fabíola. **Estudo molecular do ZIKV, BVDV e BTV em ruminantes e sua interação com dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides***. 2023. 136 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental do Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

O vírus Zika (ZIKV) foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2015, tornando-se um problema de saúde global. Apesar do ZIKV ser de origem zoonótica, faltam informações sobre a transmissão, ou mesmo a exposição de vertebrados não humanos e mosquitos ao ZIKV. Sintomas semelhantes aos que o ZIKV causa em humanos, como perda embrionária e malformação fetal, são encontrados em bovinos infectados por outros vírus como o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) que pertencente à mesma família do ZIKV, e pelo vírus da Língua Azul (BTV), da família *Reoviridae*, do qual é transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*. Ambos os vírus são responsáveis por perdas econômicas em rebanhos bovinos em todo o mundo. Apesar do BVDV e BTV não serem zoonoses, devem ser estudados, pois assim como ocorreu com o ZIKV, podem sofrer mutações ou modificações para se adaptarem ao hospedeiro humano. Nesse contexto, a fim de identificar potenciais espécies participantes no ciclo de manutenção do ZIKV no país, e sua possível reação cruzada com BTV e BVDV, 4.326 amostras de bovinos, ovinos, cervídeos e caprinos, provenientes dos cinco estados do Brasil, foram submetidas a técnica de RT-qPCR. Para o estudo entomológico dos gêneros de mosquitos *Aedes* e *Culicoides*, coletas foram realizadas nos municípios de São Pedro, Andradina, Caraguatatuba, Jaboticabal e Presidente Prudente do Estado de São Paulo. Três amostras de cervídeos foram positivas para o ZIKV, os animais eram das espécies *Mazama nana* e *Blastocerus dichotomus* oriundas de Jaboticabal/SP. 244 amostras de bovinos foram positivas para BTV e sete para BVDV, sendo cinco de fetos bovinos abortados. Nas coletas realizadas identificou-se apenas mosquitos do gênero *Culicoides*, sendo as espécies *C. pifanoi*, *C. glabellus* e *C. diffusus* com o primeiro relato no Estado de São Paulo. A confirmação de cervídeos positivos sugere que esses vertebrados foram expostos ao ZIKV e por isso devem ser motivo de atenção, pois, podem servir como reservatórios de amplificação de vírus para bovino, outras espécies selvagens e seres humanos.

Palavras-chave: arbovírus, vetores, hospedeiros, zika vírus, ruminantes.

ABSTRACT

SOUZA, Fabíola. **Molecular study of ZIKV, BVDV and BTV in ruminants and their interaction with dipterans of the genera *Aedes* and *Culicoides***. 2023. 136 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental do Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

The Zika virus (ZIKV) was first identified in Brazil in 2015, becoming a global health problem. Despite ZIKV being of zoonotic origin, there is a lack of information about the transmission, or even the exposure of non-human vertebrates and mosquitoes to ZIKV. Symptoms similar to those caused by ZIKV in humans, such as embryonic loss and fetal malformation, are found in cattle infected by other viruses such as the bovine viral diarrhea virus (BVDV), which belongs to the same family as the ZIKV, and by the Bluetongue virus (BTV), of the *Reoviridae* family, from which it is transmitted by mosquitoes of the genus *Culicoides*. Both viruses are responsible for economic losses in cattle herds worldwide. Although BVDV and BTV are not zoonoses, they should be studied because, as with ZIKV, they can undergo mutations or modifications to adapt to the human host. In this context, in order to identify potential species participating in the maintenance cycle of ZIKV in the country, and its possible cross-reaction with BTV and BVDV, 4,326 samples of cattle, sheep, deer and goats, from the five regions of Brazil, were submitted to RT-qPCR technique. For the entomological study of the mosquito genera *Aedes* and *Culicoides*, collections were carried out in the municipalities of São Pedro, Andradina, Caraguatatuba, Jaboticabal and Presidente Prudente in the State of São Paulo. Three samples of deer were positive for ZIKV, the animals were of the species *Mazama nana* and *Blastocerus dichotomus* and originated from Jaboticabal/SP. 244 bovine samples were positive for BTV and seven for BVDV, five of which were from aborted bovine fetuses. In the collections carried out, only mosquitoes of the genus *Culicoides* were identified, with the species *C. pifanoi*, *C. glabellus* and *C. diffusus* with the first report in the State of São Paulo. Confirmation of positive cervids suggests that these vertebrates were exposed to ZIKV and therefore should be a cause for attention, as they can serve as reservoirs for virus amplification for cattle and other wild species.

Keywords: arbovirus, vectors, hosts, zika virus, ruminants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Rede bipartida de vírus zoonóticos compartilhados entre hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens. O diagrama bipartido demonstra a associação entre vírus zoonóticos e espécies hospedeiras de mamíferos. As espécies hospedeiras que abrigam o mesmo vírus zoonótico são ligadas por um nó de vírus. Os nós das espécies de mamíferos são coloridos pelo status de domesticação e pela ordem taxonômica da vida selvagem terrestre não domesticada. O tamanho do nó da espécie é relativo à riqueza de vírus zoonóticos calculada nessa espécie. Humanos, que hospedam todos os vírus, não são mostrados no diagrama. Fonte: JOHNSON et al., 2020. 6
- Figura 2** As características chaves que potencializam pandemias foram avaliadas por associações com carga viral e plasticidade do hospedeiro, transmissibilidade entre pessoas e distribuição geográfica. Atividades humanas facilitam mutações de vírus de RNA gerando capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros, incluindo animais silvestres e domésticos. Fonte: Adaptado de Jonhson et al., 2015. 9
- Figura 3** Ciclos e mecanismos de manutenção e transmissão para humanos de patógenos transmitidos por mosquitos. Fonte: Adaptado de Weaver et al., 2018. 11
- Figura 4** Mapa mundial com áreas de risco para ZIKV. Fonte: CDC, 2021. 18
- Figura 5** Ciclo enzoótico e urbano do ZIKV. Fonte: SHARMA et al., 2020. 20
- Figura 6** *Culicoides sp.* Fonte: repositorio.inpa.gov.br 27
- Figura 7** Ciclo simplificado de transmissão do Bluetongue virus (BTV) em bovinos com a presença do inseto vetor (fêmeas de *Culicoides sp.*) Fonte: Adaptado de SILVA, 2017. 28

- Figura 8** Vias de transmissão do Vírus da Diarreia Viral Bovina. (Fonte: BVDZERO, 2020) 36
- Figura 9** Modelo para controle sistêmico (pontos relevantes para redução da prevalência) da diarreia viral bovina (BVDV). (Fonte: Adaptado de LINDBERG; HOUE, 2005) 39
- Figura 10** *Aedes aegypti*. (Fonte: Arquivo pessoal, 2017) 41
- Figura 11** Projeções da distribuição do *Aedes aegypti* (coluna à esquerda) e do *Aedes albopictus* (à direita) em 2050 e 2080 para o cenário de altas emissões de gases de efeito estufa. (Fonte: RYAN et al., 2019) 42
- Figura 12** Ilustração de uma fêmea de *Culicoides* spp. (Fonte: Slama; Babba; Chaker, 2017) 44
- Figura 13** Enxame de *Culicoides* picando uma mão humana. (Fonte: Matias, 2019) 46
- Figura 14** Número de amostras de ruminantes analisadas de acordo com seu Estado de origem. 50
- Figura 15** Mapa do Estado de São Paulo, indicando a localização dos municípios onde foram realizadas as coletas das amostras de ruminantes. 51
- Figura 16** Mapa do Estado de São Paulo, indicando os municípios onde foram realizados a coleta dos insetos. 52
- Figura 17** 16a - Armadilha CDC para captura de mosquitos do gênero *Aedes*. 53
16b - Armadilha de luz negra, utilizada para captura de *Culicoides*.
Fonte: Arquivo pessoal, São Pedro, 2017
- Figura 18** Procedimentos realizados nos *Culicoides* coletados. A - Lavagem com água para remoção do detergente. B - Separação dos espécimes de *Culicoides* dos outros artrópodes coletados. 54

- Figura 19** Primeiro teste da RT-qPCR para vírus Zika (Qibasa®). A) Primeira 58
curva de amplificação nas concentrações de 2×10^5 a 2×10^6
cópias/mL. B) Eficiência de reação em torno de 100%.
- Figura 20** Segundo teste da RT-qPCR para vírus Zika (Qibasa®) nas 59
concentrações de 2×10^5 a 2×10^6 cópias/mL.
- Figura 21** Gráfico de quantificação de produto de PCR em termociclador em 60
tempo real, para detecção do RNA do ZIKV. Seta maior: controle
positivo. Seta menor: três amostras positivas para ZIKV.
- Figura 22** Prevalência dos resultados positivos das amostras testadas para ZIK, 61
BTV e BVDV.
- Figura 23** Prevalência das amostras positivas testadas para BTV de acordo com 62
sua origem.
- Figura 24** Monitoramento da língua azul, em uma propriedade localizada em 65
Presidente Prudente/SP.
- Figura 25** Gel de agarose com concentração a 1,5% com produtos de PCR para 67
BVDV. Coluna BVDV: BVDV com amplificação na altura dos
290pb. ZIKV: ZIKV com amplificação na altura 200pb. 100pb:
Marcador molecular de 100pb. CN: Controle negativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência de vários sorotipos do vírus da língua azul (BTV) em todo o mundo.	25
Tabela 2	Espécies de cervídeos com amostras coletadas no NUPECCE.	52
Tabela 3	Resultados de RT-qPCR de ZIKV em cervídeos segundo a espécie.	60
Tabela 4	Informações de origem das amostras positivas para BVDV.	63
Tabela 5	Informações sobre as amostras positivas para ZIKV, BTV e BVDV.	64
Tabela 6	Espécies de <i>Culicoides</i> identificadas das coletas realizadas no Estado de São Paulo, de acordo com o subgênero ou grupo.	66

LISTA DE SIGLAS

APTA	Agência Paulista de Tecnologia Agropecuária
BTV	<i>Bluetongue virus</i>
BVD	Diarreia viral bovina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	Citopático
CSFV	Vírus da peste suína clássica
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CZS	Síndrome Congênita do Zika
DECIT	Departamento de Ciência e Tecnologia
DENV	Vírus dengue
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FC	Fixação de complemento
FNDCT	Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HPAI	Influenza aviária altamente patogênica
IB	Instituto Biológico
IBR	Rinotraqueite infecciosa bovina
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IZSAM	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
JEV	Vírus da encefalite japonesa
LA	Lingua Azul
LVB	Laboratório de Viroses de Bovídeos
MAPA	Ministério da Agricultura e Abastecimento
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações e Comunicações

MEC	Ministério da Educação
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i> (Meio Essencial Mínimo)
MS	Ministério da Saúde
NB	Nível de Biossegurança
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMSA	Organização Mundial de Saúde Animal
OROV	Vírus do Oropouche
pb	Pares de bases (nitrogenadas)
PBS	Tampão Salina Fosfatada
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PNH	Primata não humano
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RVF	Febre do Vale do Rift
RVFV	Vírus da febre do Vale do Rift
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório
SGB	Síndrome Guillian-Barré
VN	Vírus neutralização
WHO	World Health Organization
WNV	West Nile Virus
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivos Gerais	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Doenças infecciosas sob a ótica da saúde única.....	5
3.2 Doenças Infecciosas Virais.....	16
3.2.1 Vírus Zika.....	16
3.2.1.1 <i>Epidemiologia</i>	16
3.2.1.2 <i>Dinâmica de transmissão</i>	19
3.2.1.3 <i>Hospedeiros, reservatórios e vetores</i>	20
3.2.1.4 <i>Aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV</i>	22
3.2.1.5 <i>Diagnóstico</i>	23
3.2.2 Vírus da Língua Azul	23
3.2.2.1 <i>Sorotipos</i>	24
3.2.2.2 <i>Distribuição</i>	24
3.2.2.3 <i>Ciclo de hospedeiros e sinais clínicos</i>	26
3.2.2.4 <i>Transmissão</i>	26
3.2.2.5 <i>Diagnóstico</i>	28
3.2.2.6 <i>Importância Econômica</i>	30
3.2.2.7 <i>Prevenção e Controle</i>	30
3.2.3 Vírus da Diarreia Viral Bovina.....	31
3.2.3.1 <i>Manifestações clínicas</i>	32
3.2.3.2 <i>Transmissão</i>	34
3.2.3.3 <i>Epidemiologia</i>	36
3.2.3.4 <i>Diagnóstico</i>	37
3.2.3.5 <i>Profilaxia, controle e prevenção</i>	38
3.2.3.6 <i>Impacto econômico</i>	39
3.3 Dípteros de importância médico-veterinário	39
3.3.1 Gênero <i>Aedes</i> (Diptera: Culicidae).....	39
3.3.1.1 <i>História</i>	40
3.3.1.2 <i>Distribuição</i>	41
3.3.1.3 <i>Hábitos</i>	42
3.3.1.4 <i>Criadouro</i>	43
3.3.1.5 <i>Controle</i>	43
3.3.2 Gênero <i>Culicoides</i> (Diptera: Ceratopogonidae)	44

3.3.2.1 Criadouros.....	45
3.3.2.2 Importância econômica, médica e veterinária	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1 Instituições participantes	48
4.2 Comitê de Ética	49
4.3 Amostragem	49
4.3.1 Amostragem de ruminantes	49
4.3.1.1 Amostragem de ruminantes selecionadas do banco de amostras	50
4.3.1.2 Amostras de ruminantes coletadas em campo.....	50
4.3.2 Amostragem de dípteros.....	52
4.4 Preparo das amostras	54
4.5 Extração do material genético	55
4.6 Análise de ruminantes como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país 55	
4.7 Análise da interação do ZIKV com BTV e BVDV	56
4.7.1 Análise molecular do BTV e BVDV	56
4.7.2 Avaliação da reação cruzada do ZIKV com BTV e BVDV.....	56
4.8 Análise dos dípteros como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país	56
4.8.1 Identificação dos espécimes coletados	56
4.8.2 Identificação de arboviroses	57
5 RESULTADOS	58
5.1 Análise de ruminantes como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país 58	
5.2 Análise da interação do ZIKV com BTV e BVDV	61
5.2.1 Análise molecular do BTV e BVDV	61
5.2.2 Avaliação da reação cruzada entre ZIKV, BTV e BVDV.....	65
5.3 Análise dos dípteros como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país	66
5.3.1 Identificação dos espécimes coletados	66
5.3.2 Identificação de arboviroses	66
6 DISCUSSÃO.....	67
6.1 Análise de ruminantes como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país.....	67
6.2 Análise da interação do ZIKV com BTV e BVDV	75
6.3 Análise dos dípteros como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país	79
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A	128

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são a maior preocupação de saúde pública mundial (WEAVER, 2013), sendo a maioria dessas infecções de origem viral (VASCONCELOS; CALISHER, 2016; WEAVER, 2013), dentre os quais estão os arbovírus.

Arbovírus (ARthropod-BORne VIRUS) são vírus transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos e são assim designados não somente pela sua veiculação através de artrópodes, mas, principalmente, pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos (RUST, 2012). Estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, dentre as quais, mais de 150 relacionadas com doenças em seres humanos, sendo a maioria zoonótica. São mantidos em ciclo de transmissão entre artrópodes (vetores) e reservatórios vertebrados como principais hospedeiros amplificadores (CLETON et al., 2012; GUBLER, 2001).

A América do Sul, em especial o Brasil, é apontado como uma importante área para emergência e reemergência de vírus zoonóticos associada às atividades antrópicas sobre áreas de floresta e urbanização desordenada. Isso se deve não só pela grande diversidade de vírus já identificados e que circulam em ciclos enzoóticos silenciosos principalmente na Amazônia, como também pela abundante biodiversidade de potenciais hospedeiros vertebrados (WEAVER, 2013; OLIVAL et al., 2017).

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades de mamíferos do mundo e de artrópodes vetores que podem participar da manutenção do ciclo silvestre dos diversos arbovírus, em especial dos flavivírus (DIAS, 2019). Além da biodiversidade natural, a pecuária brasileira, sendo um dos principais pilares econômicos, conta com um efetivo rebanho bovino de 214,8 milhões de animais, enquanto o rebanho de ovinos e caprinos é de 19,7 milhões e 11,3 milhões de animais, respectivamente (IBGE, 2019). Além disso o país em sua maior parte, apresenta clima tropical, sendo um local adequado para a existência de vetores e, portanto, para a ocorrência de arboviroses (FIGUEIREDO, 2000), como o ZIKV.

No atual contexto epidemiológico brasileiro, os arbovírus de maior circulação são: Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e vírus Zika (ZIKV), além do vírus da febre amarela e de outros arbovírus com potencial de disseminação no país (LOPES;

NOZAWA; LINHARES, 2014). Os sinais e sintomas em seres humanos, relacionados com estas arboviroses são bastante semelhantes, o que acaba interferindo no diagnóstico clínico preciso dessas doenças (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2015). As arboviroses têm se tornado importantes e constantes ameaças (RUST, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) as tem reconhecido como um problema global de saúde pública, em virtude de sua crescente dispersão territorial e necessidade de ações de prevenção e controle cada vez mais complexas (WHO, 2009).

A incidência do ZIKV em humanos tem se mostrado bastante alta, assim como sua dispersão, cada vez maior, em todo território brasileiro. Além disso, as associações do ZIKV com a Síndrome de Guillain-Barré e, principalmente, com a transmissão vertical, resultando em casos de microcefalia têm sido motivo de alarme nacional e internacional (BRASIL, 2015).

Os *Flavivirus* transmitidos por mosquitos incluem vários vírus de grande importância epidemiológica, por causarem doenças em humanos e/ou animais de interesse econômico e por apresentarem ampla distribuição geográfica (MEDEIROS, 2009). Esse grupo de RNA vírus apresenta grande plasticidade genética e alta frequência de mutações, o que permite adaptações a hospedeiros vertebrados e invertebrados (COFFEY et al., 2013). Arbovírus, em geral, circulam entre os animais silvestres, com alguma especificidade por hospedeiros e mantendo-se em ciclos enzoóticos em poucas espécies de vertebrados e invertebrados. O homem ou animais domésticos geralmente são hospedeiros acidentais (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Alguns vírus perderam a exigência de amplificação enzoótica e produzem epidemias urbanas tendo exclusivamente o homem como amplificador vertebrado. É o caso do vírus Zika (ZIKV) (WEAVER; REISEN, 2010).

Além do gênero *Flavivirus*, a família *Flaviviridae* contempla o gênero *Pestivirus* do qual pertence o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), um importante patógeno responsável por perdas econômicas em rebanhos bovinos em todo o mundo (HOUE, 2003). Apesar de não ter comprovação científica de transmissão por vetor, o BVDV causa em bovinos, manifestações clínicas similar com os do ZIKV em humanos, como malformações em fetos. Outro arbovírus que provoca sinais clínicos semelhantes em ruminantes é o vírus da língua azul (BTV), são transmitidos por dípteros do gênero *Culicoides* Latreille, 1809. Apesar do BVDV e BTV não serem considerados zoonoses,

é importante manter a vigilância genômica dos agentes causadores dessas doenças, para monitoramento da diversidade viral, a fim de avaliar segmentos em comum entre os vírus da família *Flaviviridae* e possível interferência nos métodos diagnósticos moleculares e sorológicos, para padronizar um diagnóstico mais específico.

Recentes surtos destacam a necessidade de um novo paradigma focado na interrupção da transmissão de patógenos antes do transbordamento para humanos. No entanto, esse novo paradigma só é plausível com uma melhor compreensão dos fatores biológicos e ecológicos que impulsionam o surgimento e as estratégias de mitigação das doenças voltadas para esses fatores subjacentes. Nesse contexto, o reconhecimento das circunstâncias epidemiológicas envolvidas no transbordamento zoonótico, amplificação e disseminação de doenças é essencial para priorizar a vigilância e prever o risco futuro de emergência da doença (JOHNSON et al., 2015).

Atualmente, pouco se sabe sobre o ciclo enzoótico do ZIKV e se as infecções em animais são importantes na transmissão do vírus para humanos. Portanto, a epidemiologia e os reservatórios animais potenciais para o ZIKV não são bem compreendidos (RAGAN et al., 2017). Exemplos recentes de doenças emergentes e ressurgentes, como o vírus Zika servem como um lembrete de que a saúde dos seres humanos, animais e ecossistemas estão interconectados e que a detecção precoce e a resposta a patógenos emergentes requer uma abordagem coordenada, interdisciplinar, colaborativa, intersetorial nos níveis local, regional e global (HEYMANN; DIXON, 2013; KARESH et al., 2012). A abordagem One Health apresenta importantes oportunidades para reduzir o impacto dos eventos de emergência e para prevenir o surgimento futuro por meio de um melhor conhecimento e coordenação (JOHNSON et al., 2015).

Nesse cenário, estudos que busquem compreender o papel dos hospedeiros vertebrados silvestres e domésticos na manutenção dos flavivírus se fazem essenciais ao conhecimento da manutenção e transmissão destes vírus (FIGUEIREDO, 2000; ALTHOISE et al., 2016; BUENO et al., 2016, DIAS, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o papel de ruminantes domésticos e silvestres como potenciais reservatórios do ZIKV e sua relação com BTV e BVDV e dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides*.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o ruminante como potencial reservatório animal para o ZIKV, pela técnica de RT-qPCR;
- Avaliar ruminantes para a detecção de BTV e BVDV por RT-qPCR;
- Detectar o ZIKV e BTV em dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides* capturados em fazendas de ruminantes, pela técnica RT-qPCR;
- Identificar as espécies de *Aedes* e *Culicoides* coletados nas fazendas de ruminantes;
- Realizar o sequenciamento genômico e estudo filogenético do ZIKV, BTV e BVDV, a fim de verificar se existem semelhanças genômicas entre eles, que possam interferir no diagnóstico molecular e sorológico;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças infecciosas sob a ótica da saúde única

Novas doenças em humanos podem surgir como resultado de uma mudança na natureza ou no comportamento de microrganismos comensais que podem causar doenças em decorrência de alterações genômicas e desequilíbrio imunológico do hospedeiro, ou através de infecções por novos organismos, geralmente através do contato com animais e o ambiente, onde existe a maioria dos microrganismos (UNEP, 2020). As doenças infecciosas são consideradas como um dos maiores desafios para a saúde pública mundial (WEAVER, 2013), sendo a maioria dessas infecções de origem viral (VASCONCELOS; CALISHER, 2016; WEAVER, 2013).

Entre as infecções humanas, estima-se que cerca de 60 por cento sejam de origem animal (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005) e de todas as doenças infecciosas humanas emergentes, cerca de 75 por cento “saltam” de espécies animais (não humanos) para pessoas (TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001; UNEP, 2020).

Johnson e colaboradores (2020) analisaram dados sobre espécies de mamíferos domésticos e silvestres que compartilham vírus com humanos (Figura 1). As espécies de animais domésticos compartilham uma média de 19 (variação de 5 a 31) vírus zoonóticos com as pessoas, e as espécies de animais selvagens compartilham uma média de 0,23 (variação de 0 a 16) vírus com pessoas (JOHNSON et al., 2020). Portanto, sem surpresa, a grande maioria dos animais envolvidos em eventos zoonóticos históricos ou zoonoses atuais são domésticos (gado, animais selvagens domesticados e animais de estimação), o que é lógico, pois as taxas de contato são altas. O surgimento de uma nova zoonose de vida selvagem é extremamente raro, mas pode ser muito significativo (UNEP, 2020).

Além disso, cerca de 80 por cento dos patógenos que infectam animais são “multi-hospedeiros”, o que significa que eles se movem entre diferentes hospedeiros animais (CLEAVELAND; LAURENSEN; TAYLOR, 2001), incluindo ocasionalmente humanos. Os animais domésticos e a vida selvagem peri-doméstica também atuam como pontes para o surgimento de doenças humanas; isso pode ocorrer em um sentido

evolutivo, servindo de reservatório, ou o animal poderia servir como um transmissor mecânico do agente infeccioso (UNEP, 2020).

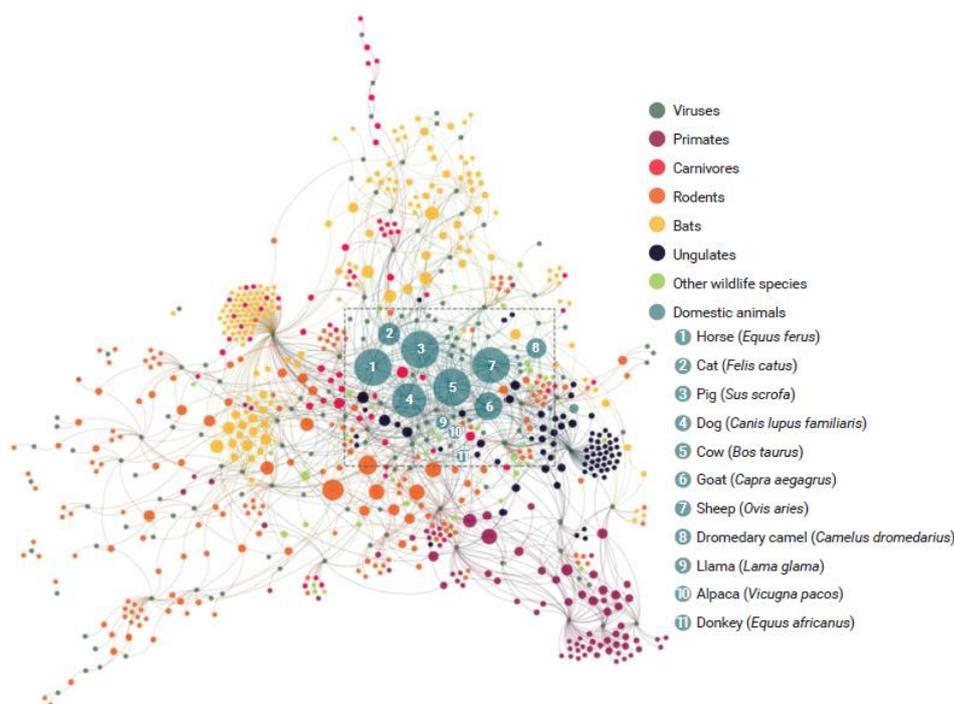


Figura 1 – Rede bipartida de vírus zoonóticos compartilhados entre hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens. O diagrama bipartido demonstra a associação entre vírus zoonóticos e espécies hospedeiras de mamíferos. As espécies hospedeiras que abrigam o mesmo vírus zoonótico são ligadas por um nó de vírus (). Os nós das espécies de mamíferos são coloridos pelo status de domesticação e pela ordem taxonômica da vida selvagem terrestre não domesticada. O tamanho do nó da espécie é relativo à riqueza de vírus zoonóticos calculada nessa espécie. Humanos, que hospedam todos os vírus, não são mostrados no diagrama. Fonte: JOHNSON et al (2020).

Historicamente, o surgimento de novas doenças humanas de animais tem sido associado a grandes mudanças sociais (UNEP, 2020). Há cerca de 5.000 a 10.000 anos, as sociedades providas de sistema de agricultura mais complexo levaram os humanos a um contato muito mais próximo com os animais através da domesticação primariamente para alimentação, trabalho e viagem. Durante essa época, muitos humanos adquiriram doenças severas, denominadas zoonoses, cuja causalidade envolve agentes infecciosos que são disseminados por meio de vetores ou se tornaram contagiosos para os humanos (CURRIER; STEELE, 2011).

Alguns desses vírus gerados em sistemas industriais e agrícolas intensivos bioinseguros resultam em formas zoonóticas do vírus. Um exemplo é a influenza aviária

altamente patogênica (HPAI), uma importante doença econômica das aves domésticas que evoluiu a partir de vírus de baixa patogenicidade que circulam comensalmente no ambiente em populações de aves selvagens. Outro exemplo é a febre do Vale do Rift (RVF), onde o gado doméstico tem servido como hospedeiro amplificador para o vírus patogênico humano e animal que originalmente circulava entre animais selvagens e mosquitos. O reservatório é o animal selvagem, enquanto o animal doméstico é o hospedeiro intermediário para a infecção humana (UNEP, 2020).

A emergência e reemergência dessas viroses têm sido desencadeadas principalmente por ações antrópicas que modificam o meio ambiente (VASCONCELOS; CALISHER, 2016; WEAVER, 2013).

De acordo com a publicação realizada pela UNEP (2020), uma ampla gama de estudos sobre o surgimento de doenças zoonóticas implica em sete fatores antropogênicos principais para o seu surgimento (JONES et al. 2008; PERRY; GRACE; SONES, 2011; JONES et al, 2013; HASSELL et al., 2017). Muitos desses fatores estão ocorrendo ao mesmo tempo nos mesmos locais, ampliando seu impacto. Uma descrição de cada um desses fatores é citada abaixo.

1. Aumento da demanda por proteína animal - Os países de alta renda experimentaram poucas mudanças no consumo de alimentos de origem animal nas últimas quatro décadas. Em contraste, o Sudeste Asiático viu um rápido aumento: desde os anos 1960, a parcela do suprimento diário de proteínas de produtos animais da região dobrou para 21%; dos peixes, aumentou pela metade para 15%.

2. Intensificação agrícola insustentável - A crescente demanda por alimentos de origem animal estimula a intensificação e a industrialização da produção animal. A intensificação da agricultura e, em particular, da pecuária doméstica (criação de animais), resulta em um grande número de animais geneticamente semelhantes. Essas populações de hospedeiros geneticamente homogêneas são mais vulneráveis à infecção do que as populações geneticamente diversas, porque as últimas têm mais probabilidade de incluir alguns indivíduos que resistem melhor à doença. Desde 1940, medidas de intensificação agrícola, como barragens, projetos de irrigação e fazendas industriais foram associadas a mais de 25 por cento de todas - e mais de 50 por cento das zoonoses - doenças infecciosas que surgiram em humanos (ROHR et al., 2019). Além disso, cerca de um terço de terras

cultiváveis são usadas para alimentação animal. Em alguns países, isso está causando o desmatamento (NEPSTAD et al., 2014).

3. Maior uso e exploração da vida silvestre - O uso e o comércio de animais vivos e mortos podem levar a um maior contato próximo entre os animais e as pessoas em toda a cadeia de abastecimento, o que aumenta o risco de surgimento de doenças zoonóticas.

4. Utilização insustentável de recursos naturais acelerada pela urbanização, mudança no uso da terra e indústrias extrativistas - A rápida urbanização, especialmente quando não planejada e com infraestrutura deficiente, cria novos e diversos contatos entre a vida selvagem, o gado e as pessoas. Por exemplo, os sistemas de irrigação estimulam a disseminação de algumas zoonoses transmitidas por vetores; o desmatamento e a fragmentação de ecossistemas e habitats de vida selvagem encorajam contatos na interface do ecossistema humano-pecuária-vida selvagem (ALLAN; KEESING; OSTFELD, 2003); e o aumento dos assentamentos humanos e cercas restringem o pastoreio e os movimentos migratórios de animais domésticos e selvagens. O turismo ecológico e os assentamentos humanos próximos a cavernas e áreas florestais, particularmente aquelas com más condições de moradia, podem aumentar o contato homem-vida selvagem e a exposição humana a insetos, carrapatos e outros vetores de patógenos da vida selvagem.

5. Viagem e transporte - O aumento das viagens e do comércio, incluindo o crescente manuseio, transporte e comércio (legal e ilegal) de animais e produtos animais, aumenta o risco de surgimento e disseminação de doenças zoonóticas.

6. Mudanças nas cadeias de abastecimento de alimentos - As cadeias de abastecimento de alimentos estão aumentando e se diversificando, especialmente em países de baixa e média renda. Essa tendência - que está sendo impulsionada pelo aumento da demanda por alimentos de origem animal, novos mercados para alimentos de animais selvagens e intensificação agrícola mal regulamentada - está criando oportunidades adicionais para a transmissão de doenças.

7. Mudanças climáticas - Muitas zoonoses são sensíveis ao clima e várias delas irão prosperar em um mundo mais quente, úmido e propenso a desastres previsto em cenários futuros (CHAN et al., 2011).

A população humana global aumentou de cerca de 1,6 bilhão em 1900 para cerca de 7,8 bilhões hoje. A população de animais domesticados que fornecem alimento às pessoas e de pragas ou “animais peri-domésticos” (como ratos) que prosperam em novos ambientes criados pelas pessoas, aumentou paralelamente. Em geral, essas populações explodindo de humanos, animais domesticados e de pragas reduziram o tamanho das populações de animais selvagens enquanto, paradoxalmente, aumentam os contatos entre pessoas, gado e vida selvagem (UNEP, 2020). As pressões antrópicas possibilitam essa diminuição de distâncias entre ecossistemas (CATENACCI, 2017) (Figura 2) e esse possível contato propicia a disseminação de agentes virais e o estabelecimento de novas relações entre hospedeiros, vetores e parasitas (BUENO et al., 2016; JOHNSON; OSTFELD; KEESING, 2015). Como consequências dessas interações podem ocorrer as zoonoses, dentre elas, as arboviroses (CATENACCI, 2017).

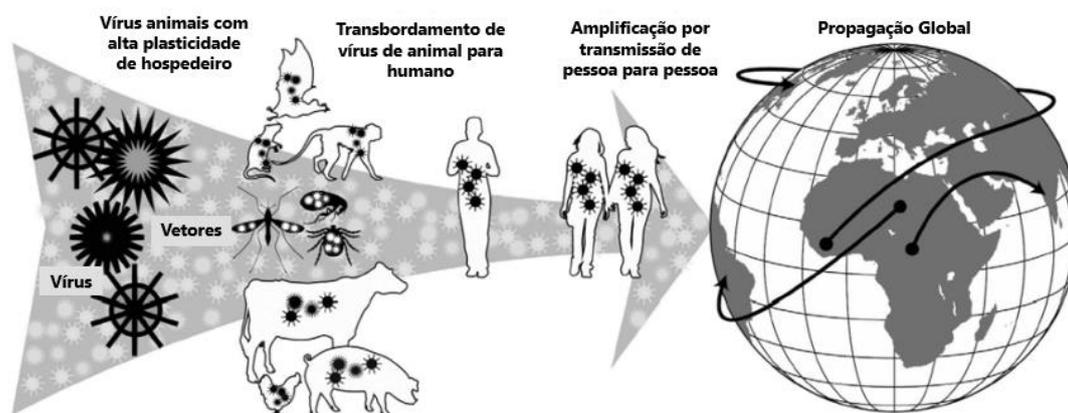


Figura 2 – As características chaves que potencializam pandemias foram avaliadas por associações com carga viral e plasticidade do hospedeiro, transmissibilidade entre pessoas e distribuição geográfica. Atividades humanas facilitam mutações de vírus de RNA gerando capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros, incluindo animais silvestres e domésticos. Fonte: Johnson et al., 2015.

As arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus ecologicamente bem definido, cuja característica epidemiológica principal é a transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados, mediada por artrópodes hematófagos (BEATY; CALISHER; SHOPE, 1989; KARABASTOS, 1985).

O surgimento de vírus transmitidos por artrópodes (arboviroses) tem sido uma ameaça à saúde humana há séculos. Quase todas as arboviroses são zoonóticas, com ciclos de transmissão ancestral na vida selvagem, e muitas das arboviroses mais importantes são transmitidas por vetores mosquitos (UNEP, 2020).

As arboviroses tem um complexo ciclo de transmissão no qual vetores, patógenos e hospedeiros interagem sob intensa influência de condições ambientais (KEESING; HOLT; OSTEFELD, 2006; LAROQUE et al., 2014; PAUTASSO et al., 2013; SWADDLE; CALOS, 2008; VASCONCELOS et al., 2001). Em ciclos de transmissão de arbovírus, os artrópodes vetores são considerados hospedeiros amplificadores definitivos, pois após infecção e amplificação viral se mantêm infectados e com capacidade de transmissão por toda sua vida. Os hospedeiros vertebrados são considerados hospedeiros amplificadores temporários, porque de um modo geral, após infecção, sustentam por apenas alguns dias uma viremia e com carga viral suficiente para infecção dos artrópodes vetores durante o repasto sanguíneo (KUNO et al., 2017). Alguns arbovírus têm mais de uma espécie de hospedeiro amplificador em seus ciclos de transmissão, sendo a espécie mais eficiente chamada de hospedeiro amplificador primário. Hospedeiros amplificadores menos eficientes são chamados de hospedeiros amplificadores secundários (CLEMENTS, 2012). Os hospedeiros vertebrados susceptíveis à infecção, mas que não participam do ciclo de transmissão, são considerados hospedeiros acidentais ou terminais, isto é, pode se infectar, mas não apresentam uma amplificação viral suficiente para servirem de fonte de infecção para o artrópode vetor (KUNO et al, 2017).

Na grande maioria dos ciclos de transmissão de arbovírus, o homem e os animais domésticos participam como hospedeiros terminais, culminando na interrupção da transmissão (WEAVER et al, 2018). De acordo com Weaver e colaboradores (2018) a infecção por humanos ocorre por meio de três mecanismos principais (Figura 3).

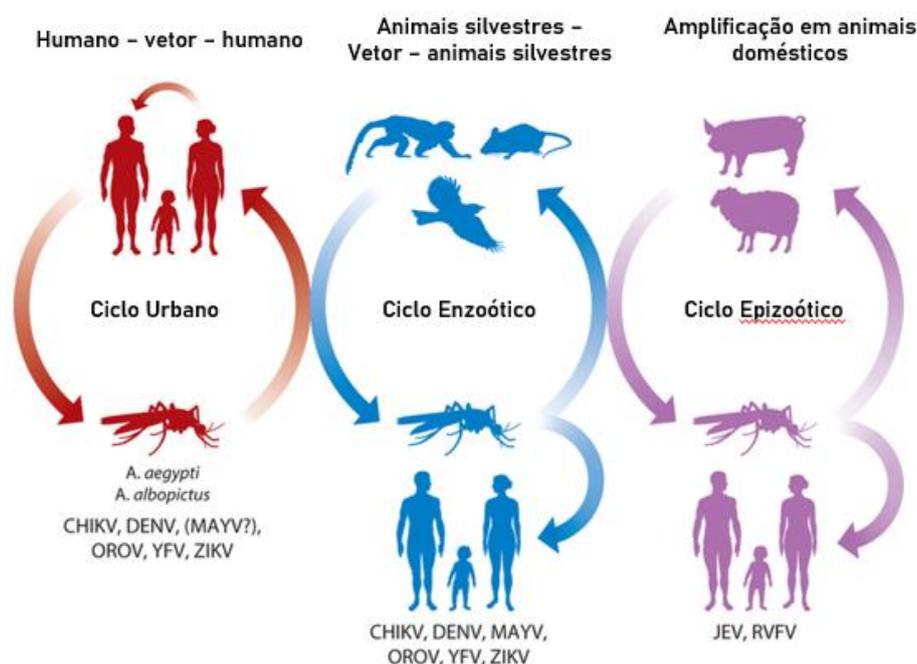


Figura 3 – Ciclos e mecanismos de manutenção e transmissão para humanos de patógenos transmitidos por mosquitos. Fonte: WEAVER et al., 2018.

O primeiro mecanismo é o transbordamento direto, onde um vetor enzoótico ou ponte transmite o vírus de um hospedeiro enzoótico para um humano. O segundo mecanismo é a amplificação em animais domesticados, seguido de derramamento para humanos; exemplos desse mecanismo incluem vírus da encefalite japonesa (JEV), um arbovírus aviário que se amplifica em suínos, que muitas vezes vivem perto das pessoas, e o vírus da febre do Vale do Rift (RVFV), que se amplifica em ovinos, bovinos e outros animais domesticados. O RVFV nunca foi detectado fora da África. Em 2016, o JEV, historicamente encontrado na Ásia e na Oceania, foi detectado pela primeira vez em uma infecção humana na África durante uma epidemia de febre amarela (SIMON-LORIERE, 2017). Nos mecanismos de derramamento e amplificação pecuária secundária, os seres humanos geralmente não desenvolvem viremia suficiente em magnitude para contribuir para a transmissão contínua. O terceiro mecanismo é a transição do ciclo enzoótico para um ciclo humano-mosquito, onde as pessoas servem como hospedeiros de amplificação e mosquitos antropofílicos como *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762), *Aedes* (*Stegomyia*.) *albopictus* (Skuse, 1894), e outros que transmitem o vírus, muitas vezes em ambientes urbanos. Arboviroses com potencial de disseminação urbana estão entre as mais importantes para a saúde pública (WEAVER et al., 2018).

Embora ainda seja imperfeito, nossa compreensão dos fatores que favorecem as doenças emergentes está em crescimento. Por exemplo, um estudo defende que o risco de doenças infecciosas zoonóticas emergentes é elevado em regiões de floresta tropical onde o uso da terra está mudando e a diversidade da vida selvagem, em termos de riqueza de espécies de mamíferos, é alta (ALLEN et al., 2017).

O Brasil se destaca como importante protagonista em arboviroses no mundo devido diversos fatores: possui a maior diversidade de arbovírus, com mais de 200 cepas isoladas (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014), maior biodiversidade de fauna, que disponibiliza uma ampla variedade de hospedeiros e vetores (FRAGOSO-MOURA et al., 2016); possui clima tropical, que facilita o aumento e manutenção de população de vetores (CATENACCI, 2017); tem um enorme tráfico ilegal de animais silvestres (LEVACOV; JERUSALINSKY; FIALHO, 2011), que aumenta a chance de circulação viral dentro do país; é um país de grande destinação turística, que favorece a entrada e saída de cepas virais (CLETON et al., 2012; FARIA et al., 2016); e possui a segunda maior taxa mundial de desmatamento (FAO, 2016), que favorece a alteração drástica de ecossistema e da ecoepidemiologia de doenças. Este país possui ainda a segunda maior taxa de desigualdade social no mundo, que favorece a criação de bolsões de pobreza com déficit em saneamento básico de água e esgoto (KIKUTI et al., 2015) e baixo investimento econômico em áreas de saúde e educação básica para a população (SOLLBERG; SCHIAVETTI; MORAES, 2014), que dificulta medidas preventivas (WALLACE et al., 2014).

Doenças zoonóticas emergentes são aquelas que aparecem recentemente em populações humanas ou que existiram anteriormente, mas agora estão aumentando rapidamente em incidência ou extensão geográfica. Felizmente, essas doenças geralmente não são altamente letais e a maioria não se espalha amplamente. Mas algumas doenças emergentes têm impactos enormes (UNEP, 2020).

O recente surgimento e rápida disseminação do vírus Zika em regiões tropicais do Hemisfério Ocidental pegou arbovirologistas e autoridades de saúde pública de surpresa e as transferências anteriores dos vírus do Nilo Ocidental e chikungunya do Velho para o Novo Mundo também foram inesperadas. Essas pandemias ressaltam a crescente ameaça de arboviroses zoonóticas, especialmente aquelas capazes de entrar em ciclos de

transmissão urbana amplificados pelo homem transmitidos pelo *Ae. aegypti* e, às vezes, outros mosquitos *Aedes* (WEAVER, 2018).

Além da importância médica, as arboviroses também constituem agravos de importância veterinária. Epizootias por arbovírus envolvendo animais domésticos e selvagens também vêm sendo reportadas por todo o mundo (DANIELS, 2001).

Diante desse cenário, o conceito One Health surge como uma abordagem multidisciplinar e holística visando estudar e correlacionar a saúde das pessoas, do meio ambiente e de animais silvestres e domésticos (DASZAK et al., 2004). Em um mundo globalizado, novas abordagens para prevenir, tratar e controlar doenças são extremamente necessárias (PATZ; HANH, 2014).

One Health ou Saúde Única é um conceito em ascensão há 11 anos, que destaca as ligações entre a saúde humana, animal e ambiental (OMSA, 2019). A proposta Um Mundo, Uma Saúde (One World, One Health), foi definida em 2008 em conjunto pela OMS, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) (OMSA, 2019; WHO, 2019). O conceito de Saúde Única foi determinado a fim de esclarecer e passar de forma transparente a coligação entre a saúde humana, a saúde animal e o ecossistema onde estão inseridos (CFMV, 2019). Tem como foco promover a saúde coletiva em sua face cosmopolita (OHC, 2019).

A Saúde Única fundamenta-se na proposta de um estreitamento das relações entre a medicina humana e a veterinária, visando ações e serviços de saúde de caráter colaborativos, auxiliando a investigação, tratamento, controle e prevenção das zoonoses (JAVMA, 2008). Porém, notou-se, que não bastava a necessidade de se controlar apenas as enfermidades nocivas à saúde dos animais, bem como as doenças oriundas do estreito convívio entre homens e animais, sem se preocupar com outro pilar relevante: a saúde do meio ambiente. Observando-se as mudanças complexas e rápidas com o surgimento da globalização, a interligação indissolúvel entre humanos, animais de companhia, de produção e selvagens e seus ambientes sociais e ecológicos se mostrou evidente (ZINSSTAG et al., 2011).

Além das zoonoses, há vários casos em que os princípios da Saúde Única podem ser aplicados, como por exemplo: segurança alimentar, resistência microbiana aos antibióticos, mudanças climáticas e a conservação da vida selvagem (KELLY et.al, 2013).

Dentre as vantagens e avanços resultantes do movimento da Saúde Única pode-se citar: a melhoria da saúde animal e humana mundial através da colaboração entre as profissões da saúde; reuniões de discussão de caráter multiprofissional para enfrentamento dos novos desafios globais; investimento no desenvolvimento de centros de excelência para a formação de profissionais multidisciplinares em áreas específicas da saúde, através da colaboração entre medicina veterinária, medicina humana e de saúde pública, aplicação do conhecimento científico no desenvolvimento de programas e ações e serviços para a melhoria da saúde (JAVMA, 2008).

Além da interdisciplinidade, são características fundamentais, dentre os profissionais atuantes nesta área, a busca por parcerias com diferentes instituições, o uso de metodologias participativas e elaboração de ações e estratégias práticas com metas bem definidas. Apesar de ser um conceito do início do século XVIII, “One Health” tem ganhado notoriedade nas últimas décadas, principalmente após a epidemia de influenza aviária (WALLACE et al.,2014).

A relação entre o meio ambiente, a biodiversidade, a sociedade humana e as doenças humanas é complexa (WHO, 2015). Embora a vida selvagem possa ser uma fonte de doenças humanas, os animais domesticados, além de fontes, podem atuar como amplificadores de patógenos emergentes da natureza. Além disso, conforme citado anteriormente, a maioria das doenças infecciosas emergentes - seja na vida selvagem, animais domésticos, plantas ou pessoas - são impulsionadas por atividades humanas, como intensificação agrícola, uso e mau uso da vida selvagem e mudanças de paisagem induzidas pelo homem, interagindo em formas imprevisíveis que podem ter resultados negativos (UNEP, 2020).

Nesse contexto, é importante reconhecer que o surgimento de doenças não envolve apenas a relação entre os animais domésticos ou a vida selvagem e as pessoas, mas também a complexidade do sistema como um todo e as interações entre os componentes bióticos e abióticos. A biodiversidade e a complexidade de nossas paisagens

são essenciais para a resiliência social e ecológica (CDB, 2017). As muitas ligações aqui incluem aquelas relacionadas ao ar, água, segurança alimentar e nutrição.

O problema das doenças infecciosas emergentes na interação animal-homem-ecossistema usualmente envolve mais de um setor ou instituição. Há mais de 2500 anos, Hipócrates já recomendava que os médicos avaliassem o local onde seus pacientes viviam, os alimentos que ingeriam, a água que bebiam, seu estilo de vida e a estação do ano em que estavam (Veterinarians Without Borders, 2010). As complexas interações entre fatores biológicos, ecológicos, ambientais e sócio-econômicos que atuam na interação animal-homem-ecossistema requerem uma aproximação multidisciplinar e multissetorial. O conceito “One World, One Health” enfatiza essa aproximação e promove a colaboração entre uma ampla variedade de intervenientes e instituições, incluindo setores públicos e de saúde animal, medicina e medicina veterinária, organizações ambientais e da vida selvagem, setores privados e instituições de pesquisa avançada em âmbito nacional, regional e internacional (FAO, 2008).

O controle e a prevenção de surtos zoonóticos requerem respostas interdisciplinares coordenadas na saúde humana, animal e ambiental (UNEP, 2020). Bem como a compreensão da epidemiologia das zoonoses e suas vias de transmissão, sendo essencial para delinear estratégias adequadas de prevenção. É importante destacar que algumas zoonoses podem apresentar um curso sub-clínico em animais selvagens, de modo a introdução de novos animais requer protocolos rigorosos de biossegurança minimizando os riscos à saúde dos contactantes e para outros animais (TAYLOR et al., 2001). Outro ponto importante é que patógenos em animais silvestres que também infectam seres humanos e animais domésticos podem comprometer a eficácia de programas sanitários nacionais e internacionais destinados ao controle e erradicação de doenças, elaborados e implementados utilizando considerável recurso financeiro e de infraestrutura (BENGIS et al., 2002).

Os presentes desafios globais evidenciam que os formuladores de políticas deverão equacionar os problemas de sustentabilidade ambiental, alimentar e sanitários no desenho de ações para o futuro. O foco deverá voltar-se mais às interconexões de fatores responsáveis pelo surgimento das doenças, mas também deverá se levar em conta seu impacto social mais amplo. Por exemplo, políticas que promovem o uso sustentável da terra, a redução do desmatamento e a proteção da biodiversidade, de forma a conciliar

atividades agropecuárias e conservação, auxiliam na redução das interações de seres humanos e animais domésticos com a vida selvagem. Assim, tais políticas contribuem para mitigar o risco do surgimento de doenças (Insper, 2020).

3.2 Doenças Infeciosas Virais

3.2.1 Vírus Zika

Pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae* (ICTV, 2019) o vírus Zika (ZIKV) é relacionado a outros arbovírus de relevância médica, transmitidos por vetores artrópodes, como os agentes causadores da dengue (DENV), febre chikungunya (CHIKV), febre amarela (YFV) e encefalite do Oeste do Nilo (WNV) (NUNES et al., 2016).

3.2.1.1 Epidemiologia

O primeiro isolamento do ZIKV foi em 1947 (DICK et al., 1952; HADDOW et al., 2012). Um grupo de cientistas do Reino Unido liderado por Haddow et al (2012) que estavam investigando a febre amarela isolaram o vírus Zika de um macaco rhesus sentinela na Floresta Zika em Uganda (DICK et al., 1952; DICK, 1952). A estirpe viral isolada foi armazenada em ATCC (ATCC® VR84™, MR 766) e no European Virus Archive (França) e é ainda utilizada para estudos.

O primeiro caso de infecção por ZIKV em humanos foi relatado na Nigéria em 1954 (MACNAMARA, 1954). Também foi demonstrado experimentalmente através de voluntários que o vírus Zika é capaz de infectar humanos (BEARCROFT, 1956). O primeiro isolamento do vírus Zika no sudeste da Ásia foi relatado em 1969 na Malásia (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969). Alguns anos mais tarde, houve outro relatório que o vírus Zika foi isolado de pacientes na Indonésia (OLSON & KSIAZEK, 1981).

Entre o primeiro isolamento do vírus Zika em macacos em 1947 e 2007, os relatos de casos humanos foram raros e esporádicos (BASARAB et al., 2016). Durante seis décadas desde sua descoberta, o ZIKV permaneceu confinado à África e à Ásia, causando surtos esporádicos (SHARMA et al., 2020). A comunidade internacional somente passou a reconhecer o potencial epidêmico do vírus Zika a partir de 2005 e principalmente após

o surto de 2007 na Micronésia e o de 2012/2013 na Polinésia Francesa (NUNES et al., 2016).

O primeiro grande surto de ZIKV ocorreu em 2007 na Ilha de Yap, Estados Federados da Micronésia, com aproximadamente 75% da população sendo afetada em um período de quatro meses (SAIZ et al., 2016). Outro surto de Zika ocorreu entre outubro de 2013 e fevereiro de 2014 na Polinésia Francesa - como a Ilha de Yap, outra ilha no Oceano Pacífico. A epidemia foi disseminada para uma grande população (6.630 casos suspeitos de infecção por vírus Zika), 333 dos quais foram confirmados por RT-PCR em tempo real como infecções pelo vírus Zika (ARMSTRONG; HOU; TANG, 2017). Casos importados foram descritos a partir de 2013 na Alemanha, no Canadá, na Itália, no Japão, nos EUA e na Austrália. Em 2014 foi descrita a presença do vírus na Ilha de Páscoa (Chile, Oceano Pacífico) onde marcou a primeira chegada do vírus Zika nas Américas (TOGNARELLI, 2016), e causou um surto explosivo no Brasil.

Os primeiros casos de infecção foram notificados do Rio Grande do Norte nos primeiros meses de 2015 (ZANLUCA et al. 2015). Em maio de 2015, o primeiro caso de transmissão autóctone foi relatado da Bahia, e em dezembro de 2015, 18 estados do Brasil haviam relatado transmissão autóctones de ZIKV. Este surto foi responsável por 440 mil a 1 300 mil casos suspeitos de infecção (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016; MUSSO; GUBLER 2016). Doravante, espalhou-se pela América Latina, Caribe e outras partes do mundo causando uma pandemia (LAZEAR E DIAMOND, 2016). Em março de 2016, a ZIKV havia se espalhado para 33 países das Américas, com cerca de 1,5 milhão de casos relatados (AYRES, 2016; PETERSEN et al., 2016). ZIKV continua a desenvolver e se espalhar silenciosamente pelo mundo na forma de infecções assintomáticas, como demonstra a figura 4 (SHARMA et al., 2020).

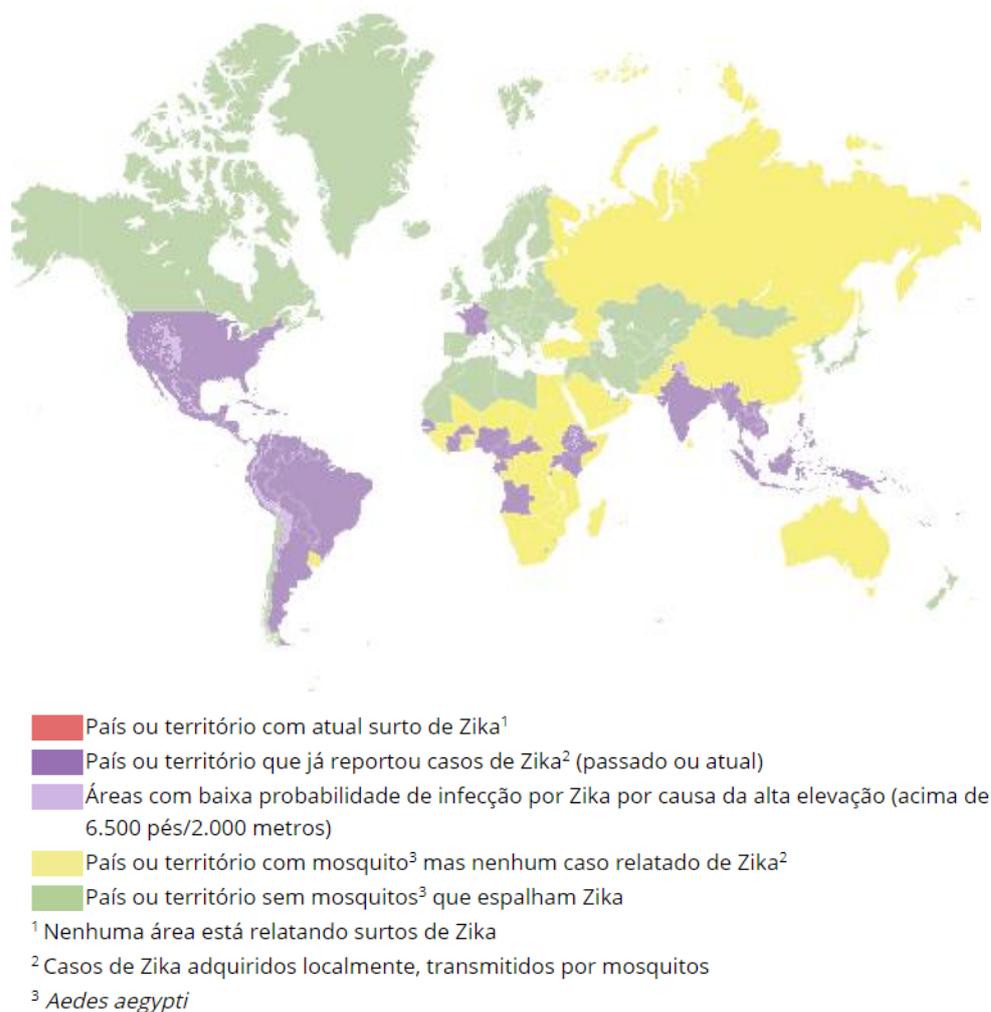


Figura 4 – Mapa mundial com áreas de risco para ZIKV. Fonte: CDC, 2021.

Análises evolutivas anteriores demonstraram que as cepas de ZIKV que circulam no Brasil pertencem à linhagem asiática (FARIA et al., 2016). No entanto, as rotas de entrada desse patógeno nas Américas permanecem obscuras e muito disputadas. Uma das hipóteses é que o ZIKV tenha entrado no Brasil durante a Copa do Mundo de 2014 (12 de junho a 13 de julho), trazido por viajantes africanos, embora essa hipótese não seja compatível com o vírus circulante no Brasil (SALVADOR; FUJITA, 2016; ZANLUCA et al., 2015). Outra hipótese afirma que a introdução do ZIKV ocorreu após um evento internacional de canoa em agosto de 2014 realizado no Rio de Janeiro, que recebeu competidores de vários países endêmicos do ZIKV no Pacífico. O relógio molecular e a análise filogenética de sete sequências do ZIKV de pacientes no Brasil sugerem uma única introdução no Brasil entre maio e dezembro de 2013, coincidindo com o aumento das viagens aéreas de áreas endêmicas do ZIKV e surtos no Oceano Pacífico (FARIA et al., 2016).

3.2.1.2 Dinâmica de transmissão

Transmitido principalmente aos seres humanos por picadas de mosquitos, especialmente *Ae. aegypti*, espécie vetora altamente competente e antropofílica (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016), outras espécies de *Aedes* têm sido implicadas na transmissão de ZIKV, principalmente em ciclos silvestres, incluindo *Ae. Africanus* (Theobald, 1901), *Ae. albopictus*, *Ae. apicoargenteus*, e *Ae. furcifer* (Edwards, 1913) (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; McCRAE; KIRYA, 1982; FAYE et al., 2014; GRARD et al., 2014). O vírus é transmitido pelo vetor hematófago durante o repasto sanguíneo, aloja-se em suas glândulas salivares, nas quais se multiplica sem afetar o inseto, permanece nesse por toda sua vida (NUNES et al., 2016). O envolvimento de uma diversidade de espécies de mosquitos na manutenção do ZIKV sugere que a dinâmica de transmissão do ZIKV é complexa (ALTHOUSE et al., 2016).

Ao contrário da maioria dos outros *Flavivirus*, ZIKV tem o potencial de transmissão significativa de humano para humano através de rotas sexuais e verticais (D'ORTENZIO et al., 2016; RUSSEL et al., 2016). Sendo detectado no sêmen de homens infectados até 188 dias após o início dos sintomas, mesmo após a viremia ter sido eliminada (NICASTRI et al., 2016). Estudos recentes têm relatado a detecção de RNA de ZIKV e carga viral infecciosa na saliva e na urina de indivíduos infectados (GOURINAT et al., 2015; BARZON et al., 2016). Durante o surto da Polinésia Francesa, o RNA ZIKV foi detectado em aproximadamente 3% dos doadores de sangue assintomáticos (fase aguda da infecção), tornando a transfusão de sangue um novo modo potencial de transmissão de ZIKV (MUSSO et al., 2014; BASARAB et al., 2016). Além de ser detectado em neonatos microcefálicos nascidos de mães com histórico de infecção por ZIKV durante a gravidez (BESNARD et al., 2014; CDC, 2016b). Cargas elevadas do RNA de ZIKV foram detectadas pela RT-qPCR no leite materno de mães infectadas, sendo as partículas infectantes em cultura de células VERO (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2016), demonstrando que o leite humano materno é uma fonte de eliminação do ZIKV. Em setembro de 2016, o primeiro caso de transmissão de ZIKV via contato físico direto foi relatado nos Estados Unidos, sugerindo ainda um sofisticado e complexo mecanismo de transmissão (SWAMINATHAN et al., 2016).

Embora mais estudos seja justificado, a capacidade única do ZIKV, em relação a outros flavivírus, de se espalhar entre humanos através de rotas não-vetoriais pode refletir um dos vários fatores, incluindo sua possível estabilidade aumentada nos fluidos corporais ou seu tropismo celular e tecidual amplo (MINER; DIAMOND, 2017).

3.2.1.3 Hospedeiros, reservatórios e vetores

ZIKV é mantido na natureza através do ciclo enzoótico ou silvestre que ocorre entre mosquitos *Aedes* e primatas não humanos. Acredita-se que o ciclo silvestre seja a razão por trás da manutenção da linhagem ZIKV na África, enquanto a transmissão silvestre não foi comprovada na Ásia. (SHARMA et al., 2020). Os principais mosquitos do gênero *Aedes*, que habitam a floresta, são *Ae. africanus*, *Ae. fuscifer*, *Ae. taylori* (Edwards, 1936), e *Ae. luteocephalus* (Newstead, 1907), que atuam como vetores enzoóticos na África (DIALLO et al. 2014; PETERSEN et al. 2016). Os seres humano são os hospedeiros acidentais em tal ciclo de transmissão e ainda carregam o vírus para a epidemia ou ciclo urbano no qual a transmissão humano-mosquito-humano do ZIKV é observada (figura 5). No ciclo urbano, os seres humanos são o principal hospedeiro e servem como amplificador e portador de infecção para mosquitos não infectados. *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são as principais espécies envolvidas nessas transmissões e têm sido notadas na maioria dos surtos de ZIKV (DIAS, 2019).

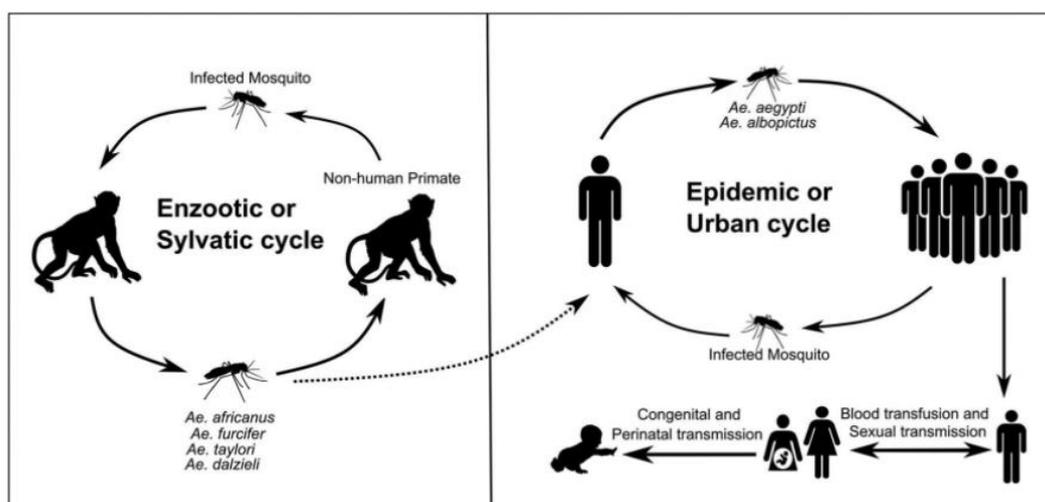


Figura 5 – Ciclo enzoótico e urbano do ZIKV. Fonte: SHARMA et al., 2020.

Em relação ao ciclo de manutenção do ZIKV em natureza, são escassas as informações acerca dos hospedeiros vertebrados (DIAS, 2019). Poucos estudos têm focado no papel dos animais como hospedeiros para ZIKV. No entanto, a maioria das arboviroses depende de espécies animais não humanos para manutenção na natureza. Muitas espécies animais agem como reservatórios para essas arboviroses, e os humanos são geralmente hospedeiros finais ou acidentais para esses vírus. O material genético e anticorpos para o vírus Zika foram detectados em várias populações de animais, incluindo primatas não humanos, animais domésticos e animais silvestres (BUENO et al., 2016).

Na África, evidências da circulação de ZIKV em animais foram detectadas pela presença de anticorpos contra o ZIKV em cabras, roedores, zebras, hipopótamos, impalas, ovelhas, gnus, leões, búfalos aquáticos e elefantes (FAGBAMI 2009, HADDOW et al. 2012). Os primatas não humanos (PNH) são os principais hospedeiros e participam da manutenção enzoótica, *Chlorocebus sabaues* (Linnaeus, 1776), *Cercopithecus spp*, *Colobus guereza* Rüppell, 1835 e *Erythrocebus patas* (Schreber, 1774) já foram encontrados naturalmente infectados (BUECHLER et al., 2017; VASILAKIS; WEAVER, 2017). Na Ásia, animais das ordens Primates, Perissodactyla, Cetartiodactyla, Artiodactyla, Anseriformes, Rodentia e Chiroptera foram encontrados naturalmente infectados (BUENO et al., 2016).

Estudos pioneiros conduzidos no Brasil conseguiram evidenciar a infecção natural de PNH pelo ZIKV, sugerindo o estabelecimento da transmissão enzoótica no continente Sul-Americano e anticorpos neutralizantes em indivíduos das famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae (FAVORETTO et al., 2016; TERZIAN et al., 2018; CATENACCI et al., 2018; MOREIRA-SOTO et al., 2018).

Alguns autores afirmam que não há evidência sólida de mamíferos selvagens, como os primatas não humanos (PNHs), como reservatórios para ZIKV (BUENO et al., 2016). Entretanto, estudos relataram anticorpos ZIKV em animais como cabras, ovelhas e roedores (DARWISH et al., 1983), leões e ungulados como Artiodactyla, Perissodactyla e Proboscidea (HENDERSON; HEWITT; LULE, 1968). Outras avaliações sorológicas fora da África identificaram anticorpos em patos, vacas, morcegos, ratos, cabras, ovelhas, orangotangos, cavalos e búfalos (DARWISH et al. 1983, WOLFE et al. 2001, VOROU 2016).

Infecções experimentais com ZIKV também vêm sendo realizadas em diferentes grupos taxonômicos, incluindo espécies silvestres e domésticas (DIAS, 2019). Uma experiência em 1955 teve como objetivo determinar a suscetibilidade dos morcegos-caverna ao ZIKV e mostrou que esses morcegos são suscetíveis ao ZIKV por exposição intraperitoneal, intradérmica, intracerebral e intrarretal, mas não pela exposição intranasal (REAGAN et al., 1955).

Em 1969, em Zika Forest, o ZIKV foi isolado de amostras de macacos (McCRAE; KIRYA, 1982). Anticorpos foram detectados em primatas da família Cercopithecidae na Nigéria em 1971 (MONATH; KEMP, 1973) e no Gabão em 1982 (SALUZZO et al., 1982).

Em Lombok, Indonésia, em 1978, os anticorpos anti-ZIKV foram detectados em patos, cabras, vacas, cavalos, bisões e búfalos carabaos, mas não em galinhas, ratos ou aves selvagens, indicando a ampla circulação do vírus em animais domésticos (OLSON et al., 1983). A questão se as aves transferem o vírus em longas distâncias permanece sem resposta (OLSON et al., 1983).

Barr, Anderson e Long (2016) infectaram culturas de células de diferentes espécies animais com ZIKV, 17 mostraram que eram suscetíveis ao vírus, desenvolvendo um efeito citopático sete dias após a infecção. Algumas das culturas celulares eram de animais domésticos e outras de primatas selvagens do Velho Mundo, enquanto nove eram de espécies de animais selvagens encontradas nas Américas: *Tadarida brasiliensis* (I.Geoffroy, 1824), *Sylvilagus floridanus* (J.A.Allen, 1890), *Urocyon cinereoargenteus* (Schreber, 1775), *Odocoileus hemionus* (Rafinesque, 1817), *Procyon lotor* (Linnaeus, 1758), *Didelphis virginiana* Kerr, 1792, *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758, *Marmota monax* (Linnaeus, 1758) e *Neovison vison* (Schreber, 1777). A maioria destes animais são peri-domésticos e sinantrópicos. Os autores também argumentaram que, com viremia suficientemente alta, esses animais poderiam servir como hospedeiros. No entanto, eles também indicaram que a estirpe do vírus utilizada no experimento não possui algumas características do ZIKV atualmente circulante no campo e que o vírus no laboratório não reflete a infecção natural.

3.2.1.4 Aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV

A infecção pelo ZIKV em humanos, em cerca de 75% a 80% dos casos, apresenta-se de forma assintomática (ATIF et al., 2016). Após um período de incubação de aproximadamente 3 a 12 dias, a manifestação mais comum é caracterizada por quadro autolimitante de febre baixa (37,8°C a 38,5°C), cefaleia, dores musculares, dores articulares nas pequenas articulações das mãos e pés, conjuntivite não purulenta, dor ocular, prostração e rash maculopapular pruriginoso (YADAV; RAWAL; BAXI, 2016; ATIF et al., 2016; AZIZ et al., 2017). Os sintomas podem durar de poucos dias até uma semana (NUNES et al., 2016). Embora a doença tenda a evoluir de forma favorável (ZANLUCA et al., 2015), o vírus tem sido associado a malformações congênitas, incluindo microcefalia e outras doenças neurológicas graves, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU et al., 2016).

3.2.1.5 Diagnóstico

O quadro clínico da infecção pelo vírus Zika em humanos é semelhante ao de outros vírus transmitidos por mosquitos, como dengue e chikungunya, que costumam co-circular nas áreas onde o vírus Zika é endêmico (BASARAB et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial do ZIKV baseia-se principalmente em testes de biologia molecular e sorológicos (FAYE et al., 2013). A amplificação do RNA viral através da *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) pode ser feita em diversos materiais biológicos, como soro, líquido, líquido amniótico, saliva e urina (MUSSO et al., 2015a). Atualmente estão disponíveis no mercado, kits comerciais para RT-qPCR para ZIKV ou multiplex incluindo ZIKV, DENV e CHIKV.

Quando disponíveis, os testes sorodiagnósticos são de escolha após a fase aguda. A interpretação dos testes sorológicos para ZIKV, como ELISA IgM e IgG ou *plaque-reduction neutralization test* (PRNT) devem ser feitos com cuidado, visto que existe reatividade cruzada para outras arboviroses, especialmente em pacientes previamente infectados com outros Flavivírus, como a dengue (LANCIOTTI et al., 2008; STAPLES et al., 2016).

3.2.2 Vírus da Língua Azul

A Língua Azul (LA) é uma doença viral, não contagiosa, transmitida por dípteros do gênero *Culicoides*, que afeta ruminantes domésticos e selvagens, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA), é uma doença de notificação obrigatória. O agente etiológico é vírus membro do gênero *Orbivirus* dentro da família *Reoviridae*, uma das maiores famílias de vírus (OMSA, 2021).

3.2.2.1 Sorotipos

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; BUMBAROV et al., 2020). Qualquer um desses sorotipos tem potencial para causar LA em ruminantes (SAMINATHAN et al., 2020). Os sorotipos isolados diferem em virulência, e algumas cepas parecem causar poucos sinais clínicos. Como outros vírus, por exemplo o vírus da gripe, as estirpes virais da língua azul podem se recombinar, e produzir novas variantes (ROVID, 2019).

3.2.2.2 Distribuição

Tradicionalmente, o vírus está presente nas regiões geográficas entre as latitudes 40°N e 35°S, considerada área de abrangência dos vetores (RODRIGUEZ-SANCHEZ et al., 2008; WILSON; MELLOR, 2009). Na América do Norte e China, a propagação do vírus atinge áreas localizadas a 50°N (MELLOR, 2000).

Baseado na distribuição do vetor e nas condições climáticas ambientais, Lobato e colaboradores (2015) classificam a língua azul em quatro zonas: (i) zona endêmica, situadas em regiões de climas tropicais, onde há presença de *Culicoides* e do vírus durante todo o ano, sem ocorrência da enfermidade, entretanto a infecção pode ocorrer; (ii) zona epidêmica, onde há presença do vetor nas estações quentes e a infecção e/ou enfermidade nessas áreas é focal e a doença clínica pode ocorrer em forma de surtos, quando as condições climáticas permitem a disseminação do vetor; (iii) zona de incursão, são aquelas em que a enfermidade aparece esporadicamente, geralmente quando *Culicoides* infectados são transportados para essas áreas por meio do vento, ou ainda devido às mudanças climáticas e (iv) zona livre, corresponde ao território onde a doença nunca foi

relatada e a possibilidade de ocorrência dela é remota, pois o clima temperado impede a circulação do vetor no ambiente.

A doença tem sido relatada em países de clima tropical e subtropical (Tabela 1) (GIBBS; GREINER, 1994). Condições de temperatura e umidade na maior parte do Brasil favorecem a multiplicação e a manutenção dos vetores, o que torna a doença endêmica e com alta prevalência de animais soropositivos e manifestação clínica rara (COSTA et al., 2006).

Tabela 1 - Prevalência de vários sorotipos do vírus da língua azul (BTV) em todo o mundo.

Distribuição geográfica	Sorotipos prevalentes de BTV *
Continente africano (África do Sul, Egito, Argélia, Líbia, Marrocos, Tunísia e Nigéria)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24
Continente europeu (França, Holanda, Alemanha, Bélgica, Espanha, Portugal, Suíça, Irlanda, Luxemburgo)	1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 25, 27
Continente norte-americano (EUA, México, Canadá)	1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 22, 24
Continente sul-americano (Brasil, Guiana Francesa, Argentina, Colômbia, Suriname, Guiana e Equador)	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 26
América Central (Guatemala) e região do Caribe (Jamaica e ilhas do Caribe)	1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 22
Continente australiano	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 16, 20, 21, 23, 24
Sul da Ásia (Índia, Paquistão, Sri Lanka, Bangladesh, Afeganistão)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24
Leste Asiático (China, Japão e Taiwan)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 23, 24, 28
Sudeste Asiático (Indonésia e Malásia)	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 20, 21, 23
Ásia Ocidental (Turquia, Chipre, Síria, Líbano, Israel, Jordânia, Omã, Kuwait, Arábia Saudita)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 16, 24, 26, 28

*Relatado por isolamento de vírus e presença de anticorpos neutralizantes. Fonte: SAMINATHAN et al., 2020.

3.2.2.3 Ciclo de hospedeiros e sinais clínicos

A incidência da doença clínica é altamente variável. A taxa de mortalidade e a severidade dos sinais clínicos são influenciadas pela espécie, raça e idade, pelo status imunológico do animal infectado, pelo sorotipo do BTV e por interações com o meio ambiente (TOMICICH et al., 2006).

A doença manifesta-se basicamente em ovinos e cervídeos, mas os bovinos podem eventualmente apresentar os sinais clínicos da enfermidade, podendo se manifestar como febre, secreção nasal serosa a sanguinolenta, posteriormente mucopurulenta, hiperemia e edema dos lábios, face, orelhas e região submaxilar (aparência de "cara de macaco"), erosões e úlceras orais, cianose da língua, claudicação com coronite, sofrimento respiratório e necrose muscular que culmina em debilidade e morte (CHANNAPPANAVAR, et al. 2011). Lesões induzidas por BTV são devido a lesão direta nas células endoteliais da microvasculatura, resultando em aumento da permeabilidade vascular, hemorragias, exsudações de fluidos, trombose e infarto do tecido (DREW et al., 2010).

Entretanto, as principais consequências da infecção pelo BTV, tanto para bovinos quanto para ovinos, são as perdas indiretas devido ao aborto, à queda do desempenho reprodutivo, à perda de condição corporal e à queda na produção de leite (para bovinos) ou convalescença prolongada (para ovinos). A restrição internacional de movimentação animal e seus germoplasmas é outra causa importante de perda econômica relacionada ao BTV (ARADAIB et al., 2005).

3.2.2.4 Transmissão

Em 1944, Du Toit, após vários estudos preliminares, demonstrou pela primeira vez que a doença era não contagiosa, mas transmitida através do repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Culicoides* (Figura 6). Os *Culicoides* adquirem o BTV quando fêmeas hematófagas ingerem sangue de um hospedeiro virêmico. 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, levando cerca de 10 dias a 25°C (Figura 7) (WELLBY et al., 1996).

Várias espécies destes vetores têm sido envolvidas na transmissão do BTV, como *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 (África), *Culicoides fulvus* Sen e Das Grupta, 1959, *Culicoides actoni* Smith, 1929 (Austrália) e *Culicoides variipennis* (Coquillett, 1901) (América do Norte) (GIBBS; GREINER, 1994), *Culicoides insignis* Lutz, 1913 (Caribe, América Central e do Sul e partes dos E.U.A). Grande variação entre os hábitos alimentares, preferência por hospedeiros e competência na transmissão da doença pode ser observada entre as diferentes espécies. Várias espécies de *Culicoides* de comprovada competência na transmissão, alimentam-se preferencialmente em bovinos do que em ovelhas (*Culicoides brevitarsis* Kieffer, 1917, *Culicoides wadai* Kitaoka, 1980, *C. fulvus*). Devido a estes vetores, alguns autores têm sugerido que os bovinos que apresentam uma viremia prolongada poderiam funcionar como reservatórios do vírus durante as estações mais frias, onde o número de vetores é menor (GIBBS; GREINER, 1994).



Figura 6 – Espécies de *Culicoides*. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

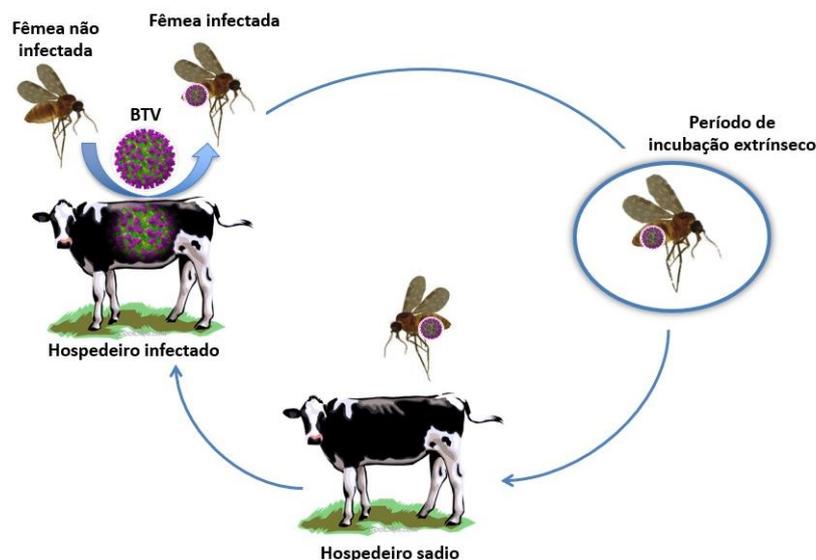


Figura 7 – Ciclo simplificado de transmissão do *Bluetongue virus* (BTV) em bovinos com a presença do inseto vetor (fêmeas de *Culicoides sp.*) Fonte: Adaptado de SILVA, 2017.

A transmissão transplacentária foi comprovada na literatura em bovinos, caprinos e ovinos (DESMECHT et al., 2008; WORWA et al., 2009; SAEGERMAN et al., 2011; ZANELLA et al., 2012; COETZEE et al., 2013). O risco da transmissão por colostro e placenta contaminada também é descrito (MENZIES et al., 2008). No âmbito reprodutivo, o sêmen fresco ou congelado possui potencial para infecção, mas não apresenta grande importância na transmissão (KIRKLAND et al., 2004; NAPP et al., 2011). Algumas estirpes do vírus da língua azul (incluindo membros dos sorotipos 1, 8 e 26) podem ser transmitidas diretamente entre ruminantes por contato direto. Esta informação é recente, e estima-se ser de pouca importância epidemiológica em comparação com a transmissão por maruins (ROVID, 2019).

3.2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de LA é essencial para o controle e erradicação de doenças e para garantir o comércio seguro de animais e seus produtos entre os países/regiões (OMSA 2018). O diagnóstico presuntivo da doença pode ser feito com base nos sinais clínicos e lesões (BATTEN et al., 2013; COETZEE et al., 2014). Enquanto que o diagnóstico definitivo da LA só pode ser obtido por análise laboratorial, por meio de isolamento viral através da inoculação em ovinos, em ovos embrionados ou em cultivos celulares; por

identificação do agente, através da vírus-neutralização (VN); por meio de detecção de anticorpos específicos utilizando-se as técnicas de imunensaio enzimático competitivo (ELISAc), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e fixação de complemento (FC) ou ainda através de técnicas de biologia molecular, pelo método de RT-qPCR (CLAVIJO et al., 2002; LAGER, 2004, OMSA 2021).

De entre os testes utilizados para a identificação direta do vírus da LA, é de importante referência o da reação em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR), que permite a rápida detecção do sorogrupo e sorotipo, podendo detectar o RNA do BTV em amostras até seis meses após a infecção e em amostras reduzidas, devido à sua elevada sensibilidade. A detecção do RNA viral por este método observa-se inclusive quando o vírus perdeu já a sua viabilidade, pelo que a sua interpretação deverá ser cautelosa, uma vez que um resultado positivo pode não representar a presença de vírus com capacidade infectante. A presença de falsos positivos pode ser justificada pela presença de amostras contaminadas com outro material genômico que não o que se pretende detectar ou com outros reagentes, como, por exemplo, outros primers utilizados no exercício da atividade laboratorial. Também falsos negativos poderão ser encontrados, devido essencialmente a amostras pobres ou primers inadequados (OMSA, 2021).

O RT-PCR em tempo real (RT-qPCR–quantitativo) possibilita uma avaliação rápida e sensível do vírus da LA com a vantagem de ser, relativamente ao PCR convencional, ainda mais rápido e sujeito a uma menor ocorrência de falsos positivos/negativos. Esta técnica possui ainda a capacidade de quantificar a carga viral numa amostra, característica não partilhada com o método convencional. Este método foi testado em vários laboratórios do mundo, sendo considerado uma das ferramentas de diagnóstico para identificação do agente etiológico, uma vez que excede a sensibilidade do nested-PCR, sendo capaz de identificar todos as variantes do vírus da LA atualmente conhecidos (SPERLOVA; ZENDULKOVA, 2011; OMSA, 2021).

Os diagnósticos diferenciais (DD) da LA estão relacionados com doenças em que o quadro clínico e respectivas lesões são similares (VEGA et al., 2005). As doenças que constituem diagnósticos diferenciais da LA são, entre outros, a febre aftosa, ectima contagioso, febre catarral maligna, estomatite vesicular, estomatite papular bovina, peeira BVD, peste dos pequenos ruminantes e bovina, fotossensibilização aguda, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), doença hemorrágica epizootica, dermatite

pustulosa contagiosa, pneumonia, intoxicação por plantas, varíola ovina, hemonose ovina aguda, oestrose ovina e a salmonelose (VEGA et al., 2005; SAVINI et al., 2011; SMITH, 2015).

3.2.2.6 Importância Econômica

As perdas econômicas ocasionadas pela LA não são expressas em números exatos, mas estima-se que os surtos de BTV causaram perdas econômicas de aproximadamente US \$ 3 bilhões em 1996 em todo o mundo (TABACHNICK, 2004). Na indústria pecuária dos Estados Unidos, o BTV causa perdas de US \$ 144 milhões anuais devido a restrições comerciais e diagnósticos para avaliação do status do BTV (HOAR et al. 2003). Entretanto, no Brasil há poucos dados a respeito (TOMICICH et al., 2009).

A infecção por BTV causa graves perdas econômicas diretas devido à alta morbidade, mortalidade, natimortos, abortos, anomalias fetais, menos peso ao nascer em bezerros, produção de leite e taxa de fertilidade reduzidas, perda de peso, abate precoce, bem como perdas de carne e lã. As perdas indiretas são devidas a restrições comerciais impostas à movimentação de ruminantes, seu germoplasma e produtos de origem animal, e despesas com vacinação, diagnóstico, controle de vetores e tratamento clínico de animais (MacLACHLAN; OSBURN, 2006; PINIOR et al., 2015; GREWAR, 2016).

3.2.2.7 Prevenção e Controle

O controle e a prevenção da infecção por BTV em ruminantes tornaram-se mais importantes devido aos impactos econômicos das doenças e às restrições ao movimento / comércio de animais (TABACHNICK, 2004; MacLACHLAN; OSBURN, 2006; GETHMANN; PROBST; CONRATHS, 2020). O BTV é facilmente inativado a 50 °C por 3 horas e 60 °C por 15 min. Além disso, o BTV é sensível ao pH quando tratado com ácidos (pH inferior a 6) ou tratado com álcalis (pH acima de 8). Desinfetantes comuns, como agentes fenólicos e iodóforos, podem inativar o BTV. No entanto, o vírus pode se manter viável por vários meses em sangue total em anticoagulante armazenados em -204°C (OMSA, 2021).

Não há terapia específica para a Língua Azul, sendo necessário realizar o tratamento de suporte (SBIZERA, 2018). Em animais doentes pode ser adotada a

antibioticoterapia profilática visando a prevenção de infecções bacterianas secundárias (RADOSTITS et al., 2007). O controle deve ser baseado em ações integradas envolvendo o vetor, o hospedeiro e o ambiente. É importante o isolamento dos sorotipos envolvidos bem como o estudo da patogenicidade dos sorotipos isolados (BALARO, 2017).

A imunização profilática por meio de vacinas é uma medida eficaz e muito utilizada em diversos países do mundo para o controle da LA. A vacinação pode reduzir as perdas econômicas, diminuindo a mortalidade animal e permitindo realizar transferências e trocas seguras de animais e seus produtos de um país para outro. A vacinação pode impedir a forma clínica da LA e pode atenuar seu curso interrompendo o ciclo do BTV no ambiente (SAVINI et al., 2008; BHANUPRAKASH et al., 2009).

Idealmente, a vacinação deve ser contra todos os 27 sorotipos devido à baixa proteção cruzada entre diferentes sorotipos. Portanto, as vacinas devem ser específicas para sorotipo. Para tanto, antes do uso da vacina em uma área, o sorotipo prevalente nessa área deve ser levado em consideração (BHANUPRAKASH et al., 2009).

No Brasil não existe um programa nacional de vigilância e monitoramento do BTV, e o uso de vacinas ainda é proibido. Isto porque os estudos de BTV no país, até o momento, são incipientes e limitados. Ainda não se sabe quais são todos os sorotipos circulantes, e tampouco quais são as espécies de vetores competentes em cada região. Contudo, o BTV representa uma ameaça constante à sanidade de rebanhos e à economia. Portanto, para a instalação de um programa de vacinação segura, torna necessário identificar quais são os sorotipos de BTV circulantes no país (SILVA, 2017).

3.2.3 Vírus da Diarreia Viral Bovina

A diarreia viral bovina (BVD) é também causada por um *Flavivirus*, assim como o ZIKV, porém, seu agente etiológico é vírus da diarreia viral bovina (BVDV) que pertence ao gênero *Pestivirus*, que contém mais dois vírus antígenicamente relacionados: o vírus da Peste Suína Clássica (Classical swine fever vírus, CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira de ovinos (Border disease vírus, BDV) (ICTV, 2019). Dentre os vírus que infectam bovinos, o BVDV é o que possui a patogenia mais complexa (DEREGT, 2005).

A análise filogenética do genoma viral do BVDV permitiu sua segregação em três genótipos: BVDV-1, BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994) e um terceiro em que Bauermann e colaboradores (2013) sugeriram como um novo grupo de BVDV, que denominaram HoBi-like, isolado de amostras de soro fetal bovino (SFB) e vacinas, de provável origem da América do Sul, especialmente do Brasil. BVDV-1 é classificado ainda por análises genéticas em torno de dezoito subtipos (1a – 1t) (JACKOVA et al., 2008; GIAMMARIOLI et al., 2014) e BVDV-2 em três subtipos (2a – 2c) (LUZZAGO et al., 2014). Além da divisão em genótipos, o BVDV pode ser constituído por dois biótipos: um não citopático (NCP) e outro citopático (CP) (RADOSTITS et al., 2002).

Os genótipos de BVDV interagem de forma diferente com o sistema imunológico, as cepas NCP podem estabelecer infecções persistentes, onde o animal persistentemente infectado (PI) é capaz de eliminar o vírus durante toda a vida, assegurando que o BVDV permaneça em circulação e transmitindo a doença para os hospedeiros suscetíveis (RIDPATH et al., 2013). As cepas citopatogênicas (CP) não produzem animais PI e estão associadas a infecções transitórias e os animais se tornam imunocompetentes por toda a vida (RIDPATH et al., 2013). No entanto, biótipo das cepas citopatogênicas pode ser encontrado em isolados de animais que apresentam forma grave da Doença das Mucosas (FLORES, et al., 2005). Embora existam ambos os biótipos citopáticos e não-citopático de BVDV-1 e BVDV-2, estirpes não citopáticas são normalmente encontradas em infecções de campo (OMSA, 2018).

3.2.3.1 Manifestações clínicas

As consequências e severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem a cepa viral (e o biótipo), a condição imunológica e reprodutiva do animal e a ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH, FLORES, 2007).

Desde sua descoberta, uma variedade de manifestações clínicas foi associada com a infecção por este agente. Essas manifestações podem ser agrupadas em três formas principais: doença aguda leve (gastroentéricas e respiratória), doença aguda severa (gastroentéricas, respiratória e hemorrágica) e doença das mucosas (RIDPATH, FLORES, 2007). Sendo que os *Pestivírus* de ruminantes (BVDV-1, BVDV-2, BDV

Hobi-like) podem causar infecções agudas ou persistentes no gado (MacLACHLAN; DUBOVI, 2011; WEBER et al., 2014).

Infecções agudas geralmente não são aparentes; quando são sintomáticas, as principais manifestações clínicas são diarreia leve, febre e sinais respiratórios que são exterminados por uma resposta imune vigorosa (MacLACHLAN; DUBOVI, 2011). Contudo, a duração dos sinais clínicos é variável e depende do tempo de viremia, virulência do vírus infectante e presença de infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2000). As infecções subclínicas explicam os títulos de soroneutralização positiva para BVDV encontrados na maioria dos bovinos não vacinados (GROOMS et al., 2006).

Em infecção aguda severa observa-se os gânglios linfáticos aumentados de tamanho, erosões e ulcerações do trato gastrointestinal, hemorragias petequiais nas superfícies serosas das vísceras. Nesta forma a pneumonia deverá ser o quadro clínico mais observado (RADOSTITS et al., 2000). Em infecções desse tipo podem ocorrer a síndrome hemorrágica, caracterizado por uma trombocitopenia, diarreia sanguinolenta, hemorragias nas superfícies mucosas da boca e vulva, hifema, pirexia (41-42°C), desidratação, leucopenia e morte (GROOMS et al., 2006). Além de bovinos jovens, onde apresenta alta mortalidade, pode afetar bovinos adultos (FLORES et al., 2005).

A Doença das Mucosas (DM) é a forma mais grave da reinfecção dos animais PI's pelo BVDV CP ou mutação do NCP em CP. A DM geralmente é relatada em animais entre seis meses e os dois anos de idade, observando-se baixa morbidade (<5%) e alta mortalidade (100%) (LINDBERG, 2003; FLORES et al., 2005). As manifestações clínicas da DM são hipertermia, anorexia, enterite catarral, hemorrágica ou fibrino-necrótica e placas de Peyer edematosas, necróticas e hemorrágicas. Lesões ulcerativas são observadas nas narinas, cavidade nasal, cavidade oral, esôfago, rúmen, omaso, abomaso, intestinos e ceco (LINDBERG, 2003). A doença gastrointestinal é apenas uma manifestação clínica da Doença das Mucosas, ou seja, as diarreias podem ser detectadas isoladamente tanto em animais transitoriamente infectados (TI) ou PI (SOBREIRA, 2018).

Porém, de acordo com Ridpath e Flores (2007), as maiores consequências da infecção pelo BVDV parecem estar relacionadas com as perdas reprodutivas. Em muitos rebanhos onde a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais

evidentes - e por vezes os únicos – da presença da infecção (BAKER, 1995). Geralmente ocorre diminuição da taxa de concepção e repetição de cio (LIEBLER-TENORIO, 2005). Em novilhas e vacas, infecções agudas com BVDV podem ocasionar ovarites, o que resulta em infertilidade temporária desses animais (ROBERT et al., 2004).

A infecção de fêmeas gestantes soronegativas pode provocar morte embrionária, múltiplos defeitos congênitos nos fetos, abortos ou o nascimento de vitelos persistentemente infectados (PI) por infecção transplacentária entre os 45 e 125 dias de gestação. A infecção pelo BVDV ainda pode provocar repetição do estro, diminuição da produção leiteira, bem como atraso no crescimento e ganho de peso (CANÁRIO et al., 2009).

Os bovinos jovens PI são a principal fonte de infecção para outros animais, eliminando para o ambiente grande quantidade de vírus durante toda a vida (GROOMS et al., 2006). Além dos animais PI, animais com infecção aguda também excretam o vírus por alguns dias (FLORES et al., 2005).

Vários estudos epidemiológicos atribuíram ao BVDV o importante papel no complexo respiratório bovino (CAMPBELL, 2004), como agente infeccioso primário ou como agente imunossupressor (c). As infecções pulmonares sinérgicas entre o BVDV e outros patógenos bacterianos são comuns durante o primeiro ano de vida (TREMBLAY, 1996), pois facilitam a colonização do trato respiratório inferior resultando em broncopneumonia fibronectínica (LONERAGAN et al., 2005).

A habilidade que o BVDV possui de interagir sinergicamente com outros patógenos não é restrita somente às enfermidades que acometem o trato respiratório, uma vez que foram descritas infecções sinérgicas com patógenos entéricos como Coronavirus e Rotavirus (KAPIL et al., 2005). A imunossupressão transitória deve-se à replicação do BVDV nos monócitos, nos linfócitos B, nos linfócitos T, nas células epiteliais do trato digestório e do trato respiratório superior (TREMBLAY, 1996; PETERHANS; JUNGI; SCHWEIZER, 2003; BASQUEIRA et al., 2020).

3.2.3.2 Transmissão

A transmissão do BVDV pode ser de forma horizontal ou vertical. A transmissão horizontal pode ocorrer pelo contato direto entre animais, principalmente pelas mucosas, o que inclui a monta natural. Bezerros PI disseminam o vírus com maiores títulos pelas mucosas nasais e oculares, isso por longos períodos (ARENHART et al., 2009), sendo este o modo mais eficiente de transmissão do vírus em condições naturais.

O vírus também é transmitido pelo contato direto com animais portadores de infecção aguda, apesar da quantidade de vírus ser consideravelmente menor e o período de eliminação mais limitado (GROOMS et al., 2006).

A transmissão indireta pode ocorrer por meio de vetores (insetos hematófagos) ou por fômites contaminados, como luvas de palpação retal reutilizadas, agulhas e material cirúrgico contaminado, espéculos nasais, uso de vacinas vivas ou contaminadas, ou através dos tratadores de animais (GROOMS et al., 2006). Este tipo de transmissão depende da estabilidade do vírus fora do hospedeiro (GONDIM, 2006).

A transmissão vertical pelo BVDV possui grande importância na epidemiologia e patogenia da doença (Figura 8). O BVDV tem a capacidade de atravessar a barreira transplacentária de fêmeas bovina com menos de 40 dias de gestação, especialmente àquelas não vacinadas, resultando em infertilidade temporária, queda nas taxas de concepção, morte embrionária, abortamento, mumificação fetal e natimortalidade. Após esse período, pode ocorrer a produção do animal PI, má formação fetal e nascimento de animais soropositivos (BAKER, 1995; LIEBLER-TENÓRIO, 2005; OMSA, 2018).

A infecção uterina do BVDV NCP de 40 a 125 dias de gestação origina animais PI's, que apresentam viremia ao longo de sua vida e imunotolerância às proteínas virais. O feto nasce infectado, porém soronegativo devido à imunotolerância (RIDPATH; BAUERMAN; FLORES, 2012). Os animais PI's são aparentemente saudáveis ao nascimento ou podem apresentar defeitos congênitos na pele, esqueleto e sistema nervoso (BAKER, 1995). A infecção das fêmeas gestantes, entre 120 a 150 dias de prenhez (fase organogênese), produz animais com má-formações e defeitos congênitos no sistema nervoso e olhos. A infecção durante o final da gestação (>150 dias) resulta em infecção transitória, com produção de anticorpos e eliminação do vírus (RADOSTITIS; LITTLEJOHNS, 1988).

Os animais PI's são as principais fontes de infecção do vírus, sendo responsáveis pela transmissão e manutenção do BVDV no rebanho, devido à liberação contínua de vírus no meio ambiente (HOUE, 1999).

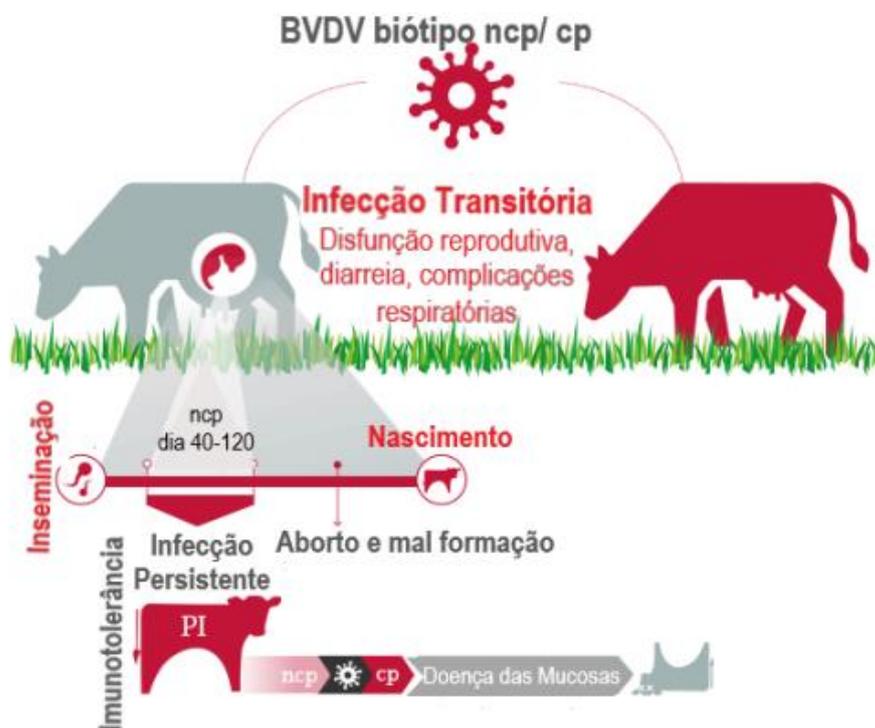


Figura 8 – Vias de transmissão do Vírus da Diarreia Viral Bovina. Fonte: BVDZERO, 2020.

3.2.3.3 Epidemiologia

O BVDV possui distribuição cosmopolita e já foi relatado em dezenas de países, dentre eles Reino Unido, Escócia, Noruega, Dinamarca, Suécia, Alemanha, Áustria, Itália, Suíça, França, Espanha, Portugal, Brasil, Cuba, Uruguai, Chile, Jordânia e Nova Zelândia, sendo que o BVDV-1 é a forma mais predominante na natureza e BVDV-2 é mais comumente associado à doença hemorrágica grave. A quantidade de anticorpos anti-BVD nos rebanhos bovinos varia de país para país e podem variar entre as regiões de um mesmo país (HOUE, 1999).

A enfermidade está amplamente distribuída nos rebanhos bovinos de corte e leite de todo o mundo e, também, no Brasil, com taxas de prevalência que podem variar de 60 a 85% de animais soropositivos (HOUE, 1999). Em 2001, a OMSA adicionou a BVD à

sua lista de doenças, tanto devido à sua propagação a nível internacional, como à sua importância para o comércio de animais (LINDBERG et al., 2006). Em países livres da febre aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de estudos e programas de controle e erradicação (FLORES et al., 2005; CANÁRIO et al., 2009; CASEY-BRYARS et al., 2022).

No Brasil vários relatos clínico-patológicos e sorológicos têm comprovado a distribuição da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos no país desde o final dos anos sessenta (FLORES et al., 2005). A prevalência na bovinocultura varia de 22,2% (THOMPSON et al., 2006) a 85,4% (QUINCOZES et al., 2007).

O vírus é capaz de infectar uma grande variedade de ruminantes como bovinos (CHAVES et al., 2012), búfalos (CRAIG et al., 2015), ovinos e caprinos (MISHRA et al., 2012), e camelos (SAFAPOOR DEHKORDI, 2011). Os bovinos são considerados hospedeiros naturais do agente (FINO et al., 2012).

A disseminação do vírus no rebanho está relacionada com a maneira pela qual ele foi introduzido. Se o BVDV for proveniente de um animal TI, a disseminação é mais lenta do que se a fonte de infecção for um animal PI, pois este elimina o vírus constantemente e em grande quantidade (TREMBLAY, 1996).

3.2.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de BVD é feito com base nas manifestações clínicas e nas lesões patológicas da doença, porém devido às diversas manifestações clínicas o diagnóstico definitivo é baseado somente em exames laboratoriais, sendo a detecção realizada por meio de métodos moleculares ou isolamento viral. O diagnóstico da BVDV pode ser realizado a partir de uma variedade de amostras como soro, sangue total, sêmen, suabe nasal, buff coat e outros tecidos (WALZ et al., 2010).

No método direto, a detecção do antígeno viral pode ser indicativa de uma infecção persistente ou transitória, para discriminar conclusivamente o diagnóstico é necessário repetir o exame (CORNISH et al., 2005).

Seja para diagnosticar casos clínicos, estabelecer prevalência de doenças em rebanhos ou regiões e detectar animais aparentemente normais, mas persistentemente

infectados, é vital detectar com precisão o BVDV (LANYON et al., 2014). Diante desse cenário, o RT-PCR se mostra um dos métodos mais sensíveis para a detecção de BVDV (HOOFT van IDDEKINGE et al., 1992; HORNER et al., 1995), sendo a técnica de RT-PCR em tempo real preconizada pela OMSA para a detecção do ácido nucleico do BVDV (OMSA, 2018).

Os métodos indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, sendo uma forma valiosa de determinar exposição prévia ao BVDV. O resultado positivo do anticorpo em um animal não vacinado indica exposição anterior ao BVDV. A alta prevalência de animais soropositivos em um rebanho não-vacinado é um indicativo de que existe PI no rebanho (LANYON et al., 2014). As técnicas indicadas pela OMSA (2018) para detecção da resposta imune contra BVDV é a técnica de ELISA e VN.

3.2.3.5 Profilaxia, controle e prevenção

Nenhum tratamento específico está disponível para animais que apresentem sinais clínicos da infecção com o BVDV (RADOSTITS et al., 2000). O objetivo do tratamento em bovinos suspeitos de infecção aguda é de suporte, visando amenizar sinais como desidratação, febre, etc, e prevenção de infecção secundária (GROOMS et al., 2006).

A identificação e eliminação de animais PI é considerado o ponto principal para o controle do BVDV e para total erradicação da enfermidade, fazendo-se necessário o controle do status sanitário da propriedade. Os animais PI, sem exceção, devem ser separados do restante do rebanho e abatidos o mais breve possível (GAROUSSI, 2007).

Preconiza-se o uso de vacinas inativadas ou vivas modificadas visando a redução dos prejuízos econômicos decorrentes das perdas de produtividade causadas pelo BVDV. Outro importante método de prevenção é a criação de programas de controle adaptados à situação epidemiológica da região (CANÁRIO et al., 2009).

Além disso, boas práticas de biossegurança são essenciais para o controle e prevenção da BVD. A introdução de animais, especialmente fêmeas prenhes, é a forma mais comum para que o vírus se introduza em explorações de leite ou carne. A compra de novilhas, vacas ou touros deve ser acompanhada por atestado negativo para o BVDV, assegurando que os animais não estão persistentemente infectados e nem com a doença

aguda. Também o período de quarentena deve ser à base de todos os procedimentos de biossegurança, prevenindo a entrada de infecções transitórias (agudas) (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005). A figura 9 apresenta um modelo de ações para o controle sistêmico da diarreia viral bovina.

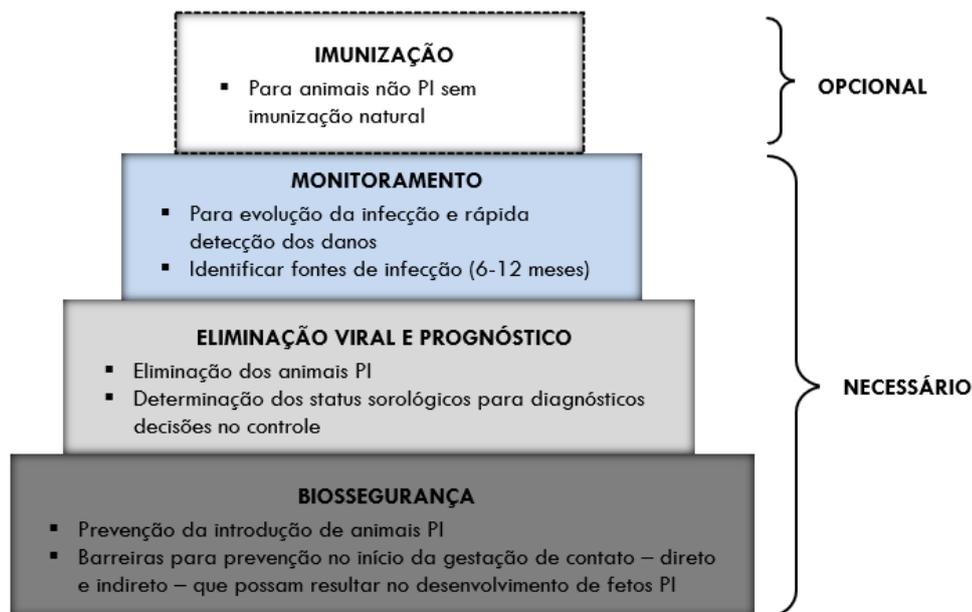


Figura 9 – Modelo geral para controle sistêmico (pontos relevantes para redução da prevalência) da diarreia viral bovina (BVDV). Fonte: Adaptado de LINDBERG; HOUE, 2005.

3.2.3.6 Impacto econômico

O vírus da Diarreia Viral Bovina é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo (BAKER 1995; FLORES 2005). O agente infeccioso é responsável por grande impacto econômico na pecuária, observando-se prejuízos entre US\$ 0,50 a 687,80/cabeça (RICHTER et al., 2017). Segundo Givens; Newcomer (2015), o custo do BVDV considerando-se todo o rebanho de corte americano é ao redor de US\$ 460 a 767 milhões por ano.

3.3 Dípteros de importância médico-veterinário

3.3.1 Gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae)

O gênero *Aedes* (Diptera Culicidae) engloba centenas de espécies, as quais apresentam distribuição mundial. Os seguintes subgêneros de *Aedes* ocorrem no Brasil: *Ochlerotatus* Lynch-Arribalzaga, 1891, *Stegomyia* Theobald, 1901, *Howardina* Theobald, 1903 e *Protomacleaya* Theobald, 1907. Uma das espécies de maior importância é o *Ae. aegypti*, por ser o principal vetor do vírus da febre amarela urbana, dengue, chikungunya e zika.

3.3.1.1 História

O *Ae. aegypti* (figura 6) provavelmente, chegou ao Brasil pelos navios negreiros, durante o período da colonização. É originária da África, região da Etiópia, mas foi descrito no Egito, daí a derivação do nome específico (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; PRATA, 2000; BROWN et al., 2011, BROWN et al., 2013). Suspeita-se que a introdução dessa espécie no Brasil tenha ocorrido no período colonial, entre os séculos XVI e XIX, durante o comércio de escravos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002). Com a destruição dos habitats naturais, devido às pressões antrópicas, uma parte da população silvestre sofreu um processo seletivo que favoreceu a disseminação e sobrevivência da espécie em aglomerados humanos (CHRISTOPHERS, 1960; CROVELLO; HACKER, 1972).

Entre 1958 e 1973, o *Ae. aegypti* chegou a ser erradicado do país por duas vezes (SOPER, 1965; NOBRE et al., 1994). Porém, os países vizinhos não tiveram a mesma preocupação com o vetor, e assim anos depois o mosquito foi reintroduzido em nosso país (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; PRATA, 2000, BROWN et al., 2011, BROWN et al., 2013). Desde então, o *Ae. aegypti* está presente em todas as Unidades da Federação do Brasil (MILLER; BALLINGER, 1988).



Figura 10 – *Aedes aegypti*. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

3.3.1.2 Distribuição

Atualmente, a distribuição geográfica do *Ae. aegypti* compreende as zonas urbanas e periurbanas das regiões tropicais e subtropicais do planeta (BRAKS et al. 2003), com recentes descrições de sua presença pela primeira vez no Canadá (BAJER, 2016). A distribuição global prevista do *Ae. aegypti* com base nos dados de ocorrência, bem como nas variáveis ambientais está indicada na figura 10.

Os pesquisadores desenvolveram um modelo de transmissão viral do *Ae. aegypti* e *Ae albopictus*, associado à temperatura. Após testar esse modelo com dados atuais de transmissão das doenças, eles projetaram o risco futuro, em 2050 e 2080, considerando cenários de baixas a altas emissões de gases de efeito estufa. Os resultados sugeriram que o número de pessoas em risco de exposição, durante pelo menos um mês do ano, à transmissão de doenças pelas duas espécies de mosquito crescerá até 2050. Estimou-se que cerca de meio bilhão de pessoas passarão a conviver com o risco de transmissão, em especial através do *Ae. aegypti*. No ano de 2080, os cenários de altas emissões levariam quase 1 bilhão de pessoas a ficarem expostas pela primeira vez ao risco de exposição sazonal ligadas ao *Ae. aegypti* (RYAN et al., 2019).

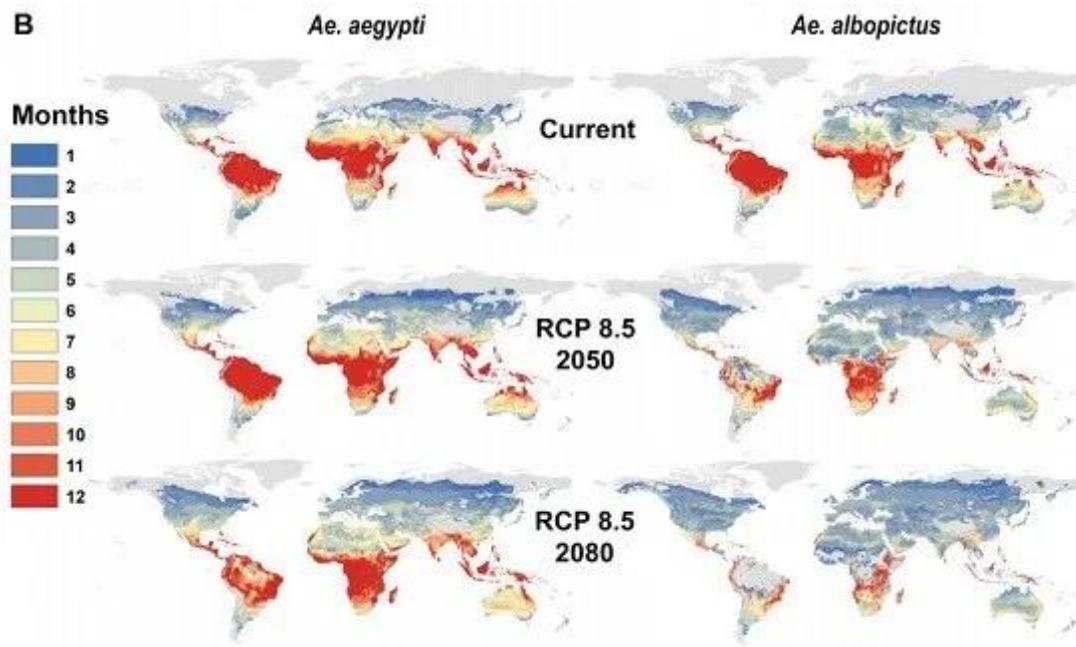


Figura 11 – Projeções da distribuição do *Ae. aegypti* (coluna à esquerda) e do *Ae. albopictus* (à direita) em 2050 e 2080 para o cenário de altas emissões de gases de efeito estufa. Fonte: RYAN et al., 2019.

3.3.1.3 Hábitos

É consenso que a partir da população silvestre, devido à destruição dos habitats naturais, uma linhagem da espécie teria sido selecionada positivamente, originando mosquitos adaptados às áreas alteradas e que posteriormente teriam encontrado nos aglomerados humanos ambiente adequado para se estabelecer (CHRISTOPHERS, 1960).

É um mosquito adaptado ao ambiente urbano, extremamente domiciliado, cujas fêmeas são hematófagas, de hábito alimentar diurno e realizam repasto sanguíneo preferencialmente em humanos, o que revela seu elevado grau de antropofilia (FORATTINI, 1962), porém, possui caráter oportunista, podendo se alimentar em qualquer horário do dia (CONSOLI; LOURENÇO-de-OLIVEIRA, 1998). Por seu comportamento cosmopolita, é capaz de acompanhar populações urbanas em busca de condições ideais de umidade e temperatura para o desenvolvimento do seu ciclo de vida (FONSECA; BRAZ, 2010).

Ao contrário do que se pensava anteriormente, o *Ae. aegypti* tem a capacidade de fazer várias ingestões de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, o que aumenta a

probabilidade de infectar-se e de transmitir os vírus para mais de um hospedeiro vertebrado (SCOTT et al., 1993).

3.3.1.4 Criadouro

Todos os depósitos que contenham água são considerados criadouros potenciais para o *Aedes*. Os ovos são depositados em criadouros variados, representados por recipientes artificiais, abandonados pelo homem a céu aberto e preenchidos por água da chuva, ou os utilizados pelos mesmos para armazenamento de água potável, ou ainda criadouros naturais, tais como: bromélias, internódios de bambu, dentre outros (FORATTINI, 1962; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

3.3.1.5 Controle

O controle do *Aedes* tem se constituído um grande desafio em saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, independentemente dos recursos direcionados para o controle do vetor (ZARA, 2016). As estratégias empregadas no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) estão concentradas na eliminação mecânica de potenciais criadouros do mosquito, na aplicação de inseticidas de ação larvicida em grandes reservatórios de água (caixa d'água, cisterna, tonel e outros) e na utilização de inseticidas larvicidas e adulticidas em pontos estratégicos, áreas que podem concentrar uma grande quantidade de criadouros do mosquito (cemitérios, ferros-velhos etc.).

Dentre as estratégias inovadoras de redução da transmissão de arboviroses, está a substituição de populações naturais de *Ae. aegypti*, altamente competentes a arbovírus, por populações de mosquitos menos susceptíveis à infecção (McGRAW; O' NEILL, 2013). Dentre as abordagens mais discutidas atualmente está a soltura de insetos refratários geneticamente modificados (FRANZ et al. 2006) ou que carregam simbiontes capazes de interferir no curso da infecção viral, como a bactéria intracelular *Wolbachia* (HOFFMAN et al. 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recentemente reforçou a necessidade de integrar diversas abordagens, propondo a estratégia de Manejo Integrado de Vetores (MIV) como forma de obter melhores resultados, tanto na redução da abundância do vetor

quanto na contenção das doenças vetoriais (ACHEE et al., 2015). O manejo integrado abrange o controle químico, biológico e mecânico.

3.3.2 Gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae)

Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) (Figura 12) constitui o gênero da família Ceratopogonidae mais abundante em número de espécies e o mais bem distribuído, podendo ser encontrado em diversos tipos de ambientes (KETTLE, 1962).



Figura 12 – Ilustração de uma fêmea de *Culicoides* spp. Fonte: Slama; Babba; Chaker, 2017.

Distribuição

Vários fatores influenciam a distribuição dos *Culicoides*, incluindo fatores abióticos e bióticos, como variáveis climáticas, principalmente temperatura e precipitação, seguidos de radiação solar, pressão de vapor de água, velocidade do vento, tipo de cobertura do solo e distribuição de gado (LETA et al., 2019).

Ocorrem em praticamente todas as grandes extensões de Terra, com exceção da Antártica e da Nova Zelândia, variando dos trópicos à tundra e do nível do mar a 4.000 m (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000). Mundialmente mais de 1.300 espécies foram identificadas, aproximadamente 290 espécies ocorrem na região neotropical e 148 no Brasil (BORKENT; DOMINIAK, 2020).

Entretanto, no Brasil, os *Culicoides* ainda são pouco estudados, quando comparados com outros grupos de insetos vetores (BARROS; MARINHO; REBÊLO, 2007). Os ceratopogonídeos hematófagos possuem diversas denominações sendo

popularmente conhecidos no Brasil como "maruim", "mosquito-pólvora" e "mosquitinho de mangue" dependendo da região em que ocorrem (FORATTINI et al., 1957; FELIPPE-BAUER, 2003).

3.3.2.1 Criadouros

O desenvolvimento dos *Culicoides* é dependente da temperatura, resultando em um padrão sazonal de atividade nas regiões temperadas que pode variar de algumas semanas a meses. Os maruins também podem passar o inverno durante os estágios larvais. Em zonas climáticas amenas, o número de insetos começa a aumentar no final da primavera e início do verão e geralmente atinge o pico no final do verão ou início do outono (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000; SICK et al., 2019). Com a chegada de temperaturas mais baixas, o número de mosquitos ativos diminui drasticamente. Em geral, mosquitos maruins adultos têm vida curta e apenas alguns indivíduos sobrevivem por mais de 10 a 20 dias e as fêmeas podem se alimentar de vários hospedeiros. Normalmente, o pico de atividade de *Culicoides* adulto ocorre por volta do amanhecer e/ou anoitecer (SICK et al., 2019).

Conhecem-se diversos microhabitats para a postura de ovos, dentre os quais destacam-se: beiras dos lagos, pequenos igarapés e rios, barro junto poças de água, acúmulos de folhas, raízes e outros produtos vegetais, fezes de gado e poças contaminadas com matéria orgânica, sistemas de esgotos, túneis de drenagens, buracos em árvores, bainhas de pencas de frutos de palmeiras no chão, etc. (USLU; DICK, 2010; GONZALEZ GONZALEZ DE HEREDIA; GOLDARAZENA LAFUENTE, 2011).

As larvas e pupas de maruins podem desenvolver-se em poças, correntezas, brejos, lamaçais, praias, pântanos, buracos de árvores, irrigações, solos saturados, esterco de animais e tecidos de frutas ou outros vegetais em decomposição (MELLOR et al., 2000). Os insetos adultos podem ser encontrados desde ambientes florestais úmidos, poças, praias, montanhas e mangues, a abrigos de animais domésticos de zonas rurais, periurbanas e urbanas (chiqueiros, galinheiros, curral) (KETTLE, 1977; VERAS; CASTELLÓN, 1998a,b; CARVALHO; SILVA, 2014; FARIAS et al., 2015).

3.3.2.2 Importância econômica, médica e veterinária

Alguns gêneros da família Ceratopogonidae fornecem serviços importantes em sistemas ecológicos. Algumas espécies são os polinizadores primários de plantas como o cacau e as seringueiras, e as larvas de algumas espécies são predadoras significativas de outros organismos em habitats aquáticos (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000). No entanto, os insetos do gênero *Culicoides* são hematófagos, as fêmeas atacam animais, incluindo o homem. Em algumas regiões, as populações de maruins são tão numerosas que chegam a virar verdadeiras pragas. Esses pequenos dípteros são importantes à saúde humana e animal por serem molestos e transmissores especialmente de vírus e filárias (CASTELLÓN; VERAS, 2015), sendo algumas espécies implicadas em doenças da pecuária com importância econômica, veterinária e de saúde pública (BORKENT, 2005).

A picada dos *Culicoides* causa grande incômodo, principalmente quando presente em grande quantidade (Figura 13). Ela pode causar reações como dermatites alérgicas, pápulas, pústulas até reações mais graves como eczema, descamação e cicatrizes com pigmentação anormal da pele (FORATTINI et al, 1957; SHERLOCK, 1965; RONDEROS et al., 2003). A hipersensibilidade a picada de insetos é uma das doenças de pele mais comuns em animais como cavalos e ao homem sendo causada principalmente por proteínas presentes na saliva das fêmeas (SPINELLI; WIRTH 1993; RONDEROS et al. 2003). Por causa de seu tamanho algumas espécies podem passar por telas e redes que mantêm outras pragas de fora e podem tornar a vida insuportável.



Figura 13 – Enxame de *Culicoides* picando uma mão humana. Fonte: Matias, 2019.

O ataque que algumas espécies de *Culicoides* realizam sobre vertebrados, incluindo o homem, pode causar impacto no desenvolvimento de áreas úteis para a agricultura, pecuária e turismo, tornando esse gênero de grande importância tanto a nível

médico e veterinário, como também para a economia e o meio ambiente (COSTA et al., 2013).

Em todo o mundo, mais de 50 arbovírus foram isolados de *Culicoides*, a maioria das famílias *Bunyaviridae* (20 vírus), *Reoviridae* (19 vírus) e *Rhabdoviridae* (11 vírus). Muitos desses vírus foram isolados com mais frequência de outros grupos de artrópodes e sua associação com espécies de *Culicoides* é provavelmente acidental. Os patógenos humanos da febre do Vale do Rift, estomatite vesicular, vírus do rio Mitchell e da encefalomielite equina oriental, que são transmitidos principalmente por mosquitos, estão todos nessa categoria. No entanto, 45% dos vírus isolados de *Culicoides* não foram isolados de outros artrópodes (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000).

Entre os vírus transmitidos por *Culicoides*, o vírus do Oropouche (OROV) é uma das infecções por arboviroses humanas mais comuns no Brasil e mais de 30 grandes surtos e meio milhão de casos foram notificados desde que foi isolado pela primeira vez em 1955 em Trinidad e Tobago (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

Em animais, há transmissão do vírus da encefalite equina isolados de maruins na América do Sul (LINLEY et al. 1983). O vírus da Língua Azul “Bluetongue”, onde *C. insignis* Lutz é vetor da enfermidade, é transmitido a ruminantes domésticos e selvagens, a exemplo de bovinos, ovinos, caprinos e cervos provocando suas mortes, podendo assim acarretar implicações no comércio de animais e produtos de origem animal (GORCH; LAGER 2001; GORCH et al. 2002).

Como os *Culicoides* usam uma ampla gama de habitats, a transmissão também ocorre em amplas regiões em ambientes agrícolas intensivos e extensivos, florestas e áreas periurbanas. Os sistemas de arbovírus transmitidos por *Culicoides* são ecologicamente complexos, envolvendo vários vetores e hospedeiros em uma única região. *Culicoides* são poiquilotérmico e requer locais de desenvolvimento semiaquático, de modo que as taxas demográficas e as interações com o hospedeiro são sensíveis a variações sutis de temperatura e umidade. Portanto, o sucesso dos mosquitos *Culicoides* como vetores de arbovírus está relacionado aos vastos tamanhos populacionais que podem ser alcançados em condições climáticas adequadas e aos seus meios de dispersão. Conseqüentemente, a epidemiologia das doenças virais de *Culicoides* está fortemente ligada ao clima e ao tempo (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo integra parte do projeto intitulado “Estudo do vírus zika em bovinos com BVDV e BTV e sua interação com mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culicoides* no Estado de São Paulo”. Aprovado e financiado pela Chamada MCTIC-CNPQ/ MEC-CAPES/ MS-DECIT / FNDCT N° 14/2016 –PREVENÇÃO E COMBATE AO VÍRUS ZIKA, sob a supervisão da Dr. Liria Hiromi Okuda, responsável técnica do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo (LVB-IB/SP), no período de 2016 a 2020.

4.1 Instituições participantes

Este estudo foi realizado no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo (LVB-IB/SP) e contou com o apoio e participação do Instituto Zooprofilattico Sperimentale dell’ Abruzzo e del Molise “G.Caporale” (IZSAM), Teramo, Itália, Laboratório de Referência OMSA para Bluetongue. Este instituto contribuiu com treinamentos sobre a coleta e identificação de mosquitos e o diagnóstico de BTV. Ainda contamos com a colaboração do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Fazenda Experimental da APTA (Agência Paulista de Tecnologia Agropecuária) e da Coleção de Ceratopogonidae da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/CCER).

O NUPECCE fundado e localizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal-SP, é um dos principais centros mundiais de pesquisa e conservação de cervídeos neotropicais. Desenvolve trabalhos nas áreas de ecologia, reprodução, genética, educação, manejo em cativeiro e em vida livre. Participa na criação de instrumentos legais e de políticas públicas visando a conservação e manutenção de diversas espécies de Cervídeos de ocorrência no Brasil e em diferentes países da América Latina (NUPECCE, 2021). A Fazenda Experimental da APTA - Polo Regional Extremo Oeste localizada na cidade de Andradina/SP, sendo a propriedade voltada à pesquisa científica e leilões de reprodutores. A Coleção de Ceratopogonidae da Fiocruz possui acervo com milhares de espécimes da fauna neotropical de interesse sanitário e agrícola, constituindo uma das maiores coleções da família na América Latina.

4.2 Comitê de Ética

Os procedimentos realizados nesse estudo foram conduzidos seguindo as diretrizes éticas adotadas pela Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, protocolo N° 159/18 (Apêndice A).

4.3 Amostragem

O presente estudo foi do tipo transversal e longitudinal, onde para se identificar potenciais espécies participantes no ciclo de manutenção do ZIKV no país e sua possível relação com BTV e BVDV, analisamos amostras clínicas de ruminantes domésticos e silvestres, sendo parte das amostras selecionadas do banco de amostras do Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico e parte coletadas em campo. Também foram coletados dípteros para a análise dos gêneros *Aedes* e *Culicoides* como transmissores do ZIKV.

4.3.1 Amostragem de ruminantes

Nosso estudo contemplou amostras de ruminantes domésticos como bovinos, ovinos e caprinos e ruminantes silvestres como cervídeos, fruto da parceria que o Laboratório de Virose de Bovídeos possui com o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Espécies Silvestres (Nupecce – Unesp Jaboticabal), que por sua vez tem parcerias com parques nacionais.

Dessa forma, o total de amostras de ruminantes analisadas foi de 4326 amostras, sendo 3900 amostras de bovinos, 324 de ovinos, 98 cervídeos e quatro de caprinos. As matrizes estudadas foram amostras de sangue (4132), tecido (43 de adultos) e órgãos fetais (151), provenientes das cinco regiões do Brasil (Figura 13).

Número de amostras de ruminantes analisadas de acordo com sua origem



Figura 14 - Número de amostras de ruminantes analisadas de acordo com seu Estado de origem.

4.3.1.1 Amostragem de ruminantes selecionadas do banco de amostras

O Laboratório de Virose de Bovídeos atende protocolos de exportação de bovinos vivos e pesquisas com outros ruminantes, dessa forma, selecionamos do seu banco de amostras, de forma conveniente, 2636 amostras, sendo 2485 amostras de animais adultos (2086 de bovinos, 308 de ovinos e 91 de cervídeos) e 151 amostras de órgãos fetais (131 de bovinos, 16 ovinos e quatro de caprinos). As amostras selecionadas por conveniência eram referentes ao período de 2011 a 2017 e provenientes das cinco regiões do Brasil.

4.3.1.2 Amostras de ruminantes coletadas em campo

Entre os anos 2017 e 2019, foram coletadas 1690 amostras de sangue, sendo 1683 de bovinos e sete de cervídeos no Estado de São Paulo, nos municípios de Andradina, Caraguatatuba, Jaboticabal e Presidente Prudente (Figura 15).

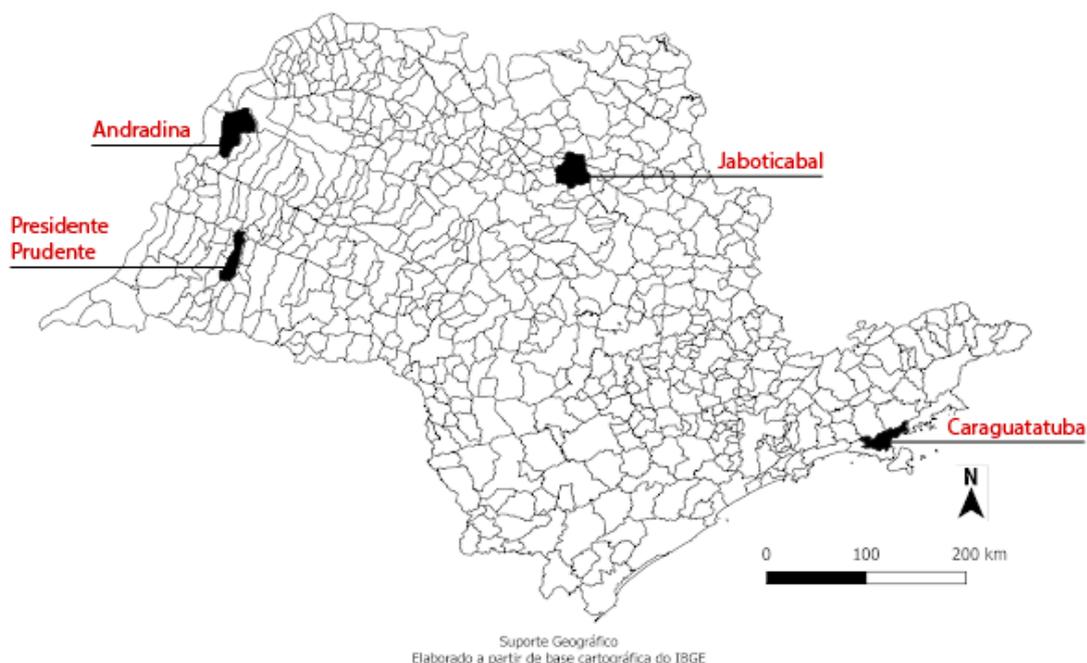


Figura 15 – Mapa do Estado de São Paulo, indicando a localização dos municípios onde foram realizadas as coletas das amostras de ruminantes.

Em Andradina foram realizadas duas coletas na Fazenda Experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) – Polo Regional Extremo Oeste. A primeira coleta foi realizada em novembro de 2017, sendo 141 amostras de sangue de bovinos e a segunda, em fevereiro de 2018, com 570 amostras de sangue de bovinos. O total de bovinos amostrados nas duas coletas foi de 711 animais, de ambos os sexos, de diferentes idades e das raças Nelore (628/711) e Aberdeen Angus (76/711), e criados em sistemas zootécnicos distintos, sendo o sistema extensivo para Nelore e sistema agrossilvipastoril para Aberdeen Angus.

A coleta realizada em Caraguatatuba, em março de 2018, contou com o total de 950 amostras de sangue de bovino. Os animais, todos machos, tinham idade igual ou superior a 12 meses e eram da raça europeia (163/950) e Cruzado (787/950). Já coleta do município de Jaboticabal foi realizada no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), onde amostras de sangue de sete cervídeos foram coletadas, sendo cinco amostras da espécie *Mazama gouazoubira* G.Fischer, 1814, uma amostra de *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758) e uma amostra de *Mazama bororo* Duarte, 1996. Os dados referentes a idade e sexo dos animais estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Espécies de cervídeos com amostras coletadas no NUPECCE.

Espécies	Nome popular	Nascimento	Sexo
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	08/08/2018	Fêmea
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	04/04/2018	Fêmea
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	30/05/2013	Macho
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	27/09/2016	Macho
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	13/012/2003	Fêmea
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	Veado-campeiro	09/11/2018	Macho
<i>Mazama bororo</i>	Veado-mateiro-pequeno	NI	Fêmea

NI= Não informado

Em uma propriedade no município de Presidente Prudente, após a detecção de animais positivos para BTV, sete bovinos foram monitorados para este agente através de amostras de sangue, no período de abril a agosto de 2019.

4.3.2 Amostragem de dípteros

A amostragem dos dípteros teve como alvo espécies dos gêneros *Aedes* e *Culicoides*. Sempre que possível, as coletas foram realizadas no mesmo local e tempo em que ocorreram as coletas de amostras de ruminantes. Dessa forma a coleta dos dípteros foi realizada no período de 2017 a 2020, nos municípios de São Pedro, Andradina, Caraguatatuba, Jaboticabal, Presidente Prudente e Cananéia, todos pertencentes ao Estado de São Paulo (Figura 16).

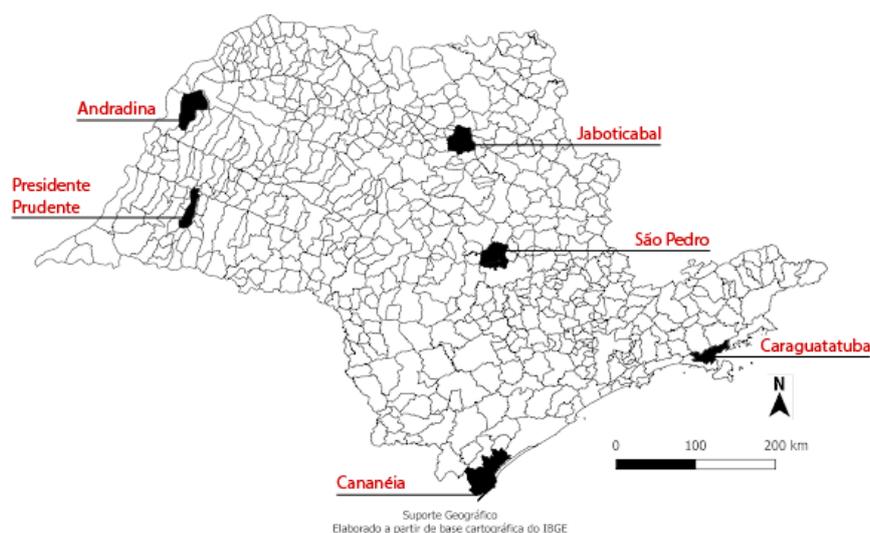


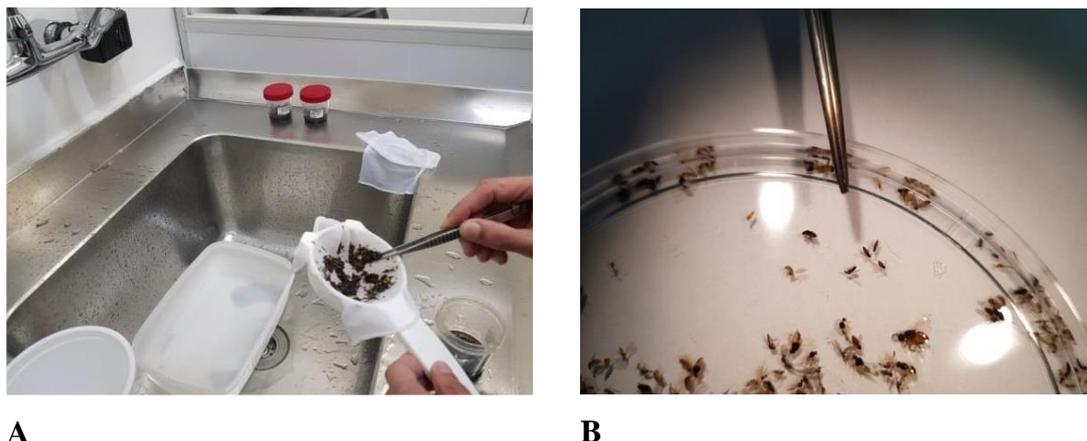
Figura 16 – Mapa do Estado de São Paulo, indicando os municípios onde foram realizadas a coleta dos insetos.

Para captura dos insetos dos gêneros *Aedes* e *Culicoides* foram utilizadas armadilhas do tipo CDC (SUDIA; CHAMBERLAIN, 1988) e as armadilhas de luz negra (VENTER; MEISWINKEL, 1994) (Figura 17). Ambas as armadilhas possuíam na parte superior uma lâmpada de ultravioleta para atrair os mosquitos e ventilador para sugar os insetos e na parte inferior, contém um copo coletor com água e detergente onde os insetos capturados ficaram armazenados (GOFFREDO; MEISWINKEL, 2004).

**A****B**

Figura 17 - **A** - Armadilha CDC para captura de mosquitos do gênero *Aedes*. **B** - Armadilha de luz negra, utilizada para captura de *Culicoides*. Fonte: Arquivo pessoal, São Pedro, 2017

Os espécimes coletados foram transportados ao LVB, onde foram submetidos à lavagem com água para remoção do detergente e separação dos demais insetos coletados (Figura 17). Após, foram mantidos em álcool, sendo que parte dos insetos foram submetidos à identificação ao estereomicroscópio e parte submetidos à detecção molecular do BTV.



A **B**
Figura 18 - Procedimentos realizados nos *Culicoides* coletados. A - Lavagem com água para remoção do detergente. B - Separação dos espécimes de *Culicoides* dos outros artrópodes coletados.

4.4 Preparo das amostras

Todas as etapas laboratoriais envolvendo manipulação das amostras biológicas compostas por sangue, órgãos fetais e tecido, bem como artrópodes, foram realizadas com uso de barreiras de contenção primária através da utilização de equipamentos de proteção individual como jaleco, máscara, luvas e equipamentos de proteção coletiva como cabine de segurança biológica II Tipo B em Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB-2) e em Laboratório de Biossegurança 3 (NB-3) de contenção secundária.

As amostras de sangue passaram pelo procedimento de lavagem das hemácias, realizado de acordo com as recomendações preconizadas no Manual Padrão para Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OMSA (2016). O sangue foi centrifugado a 3.000 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 amostras de órgãos fetais e tecidos foram maceradas utilizando-se pistilos e recipientes de louça estéreis e uma suspensão de 20% (peso/volume) foi preparada com 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.

O preparo dos espécimes para identificação molecular do BTV e ZIKV nos espécimes de insetos coletados seguiu-se de acordo com o protocolo do IZSAM Teramo – Itália. Dessa forma, os espécimes foram separados em pools, sendo estabelecido pool mínimo de 5 até máximo de 50 espécimes, de acordo com o número de insetos capturados nas armadilhas. Após, foram macerados em pistilos e recipientes de louça estéreis e utilizando 0,5 ml de tampão PBS, denominado meio de maceração. O volume final era então aspirado e transferidos para microtubos de 1,5 mL devidamente identificados, posterior utilização em técnicas moleculares.

4.5 Extração do material genético

As amostras de sangue, órgãos fetais, tecidos e dípteros foram submetidas a extração do ácido nucleico por sílica, utilizando o kit de extração comercial Cador Pathogen 96 QIacube HT (Qiagen®) específico para extração de RNA, em sistema extrator automatizado QIacube HT (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante.

4.6 Análise de ruminantes como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país

Para identificar espécies participantes no ciclo do zika vírus, as amostras de ruminantes foram submetidas a RT-PCR em tempo real para detecção específica do ZIKV, utilizando-se o kit comercial Bio Gene Zika Virus PCR (Qiabasa®) para 50 testes. O kit contempla todos os reagentes necessários para a realização da RT-qPCR (transcriptase reversa, primers, sondas, master mix, Taq polimerase e água) bem como os controles negativo, interno e positivo (Zika 2×10^5 cópias/mL).

Para que a reação de PCR seja altamente específica, sensível, eficiente e que permita reprodutibilidade, foi necessário realizar a validação desse ensaio. Dessa forma, o controle positivo foi eluído em água nuclease free, conforme instruções do fabricante, este foi diluído em base 10 correspondendo as concentrações de 2×10^5 até 2×10^0 cópias/mL. Todas as concentrações foram testadas, por reação, em sextuplicata, com três repetições em placa de 384 cavidades, em dias alternados, utilizando a estação de

pipetagem automatizada Ep-motion 5075 (Eppendorf®) para distribuir a mistura da reação e as amostras. O volume final de reação foi de 10 µL, sendo usado 7.5 µL de mix de reagentes e 2.5 µL de RNA.

4.7 Análise da interação do ZIKV com BTV e BVDV

4.7.1 Análise molecular do BTV e BVDV

Para o estudo da interação do ZIKV com BTV e BVDV, todas as amostras de ruminantes coletadas também testadas para a detecção do BTV através da técnica de RT-qPCR segundo o manual da OMSA (2018) e para a detecção do BVDV, onde foi empregado o kit VETMAX Gold BVDV® para RT-qPCR da ThermoFisher®, já utilizados na rotina diagnóstica do laboratório.

4.7.2 Avaliação da reação cruzada do ZIKV com BTV e BVDV

Foram realizados testes moleculares cruzados entre ZIKV, BTV e BVDV, no sentido de avaliar possíveis resultados falso-positivos, por conta de estarmos avaliando vírus da mesma família, como ZIKV e BVDV. Para tanto, o RNA do vírus zika foi testado na RT-qPCR para BTV e RT-PCR convencional e RT-qPCR para BVDV (detecta os três genótipos I, II e Hobi-like) e vice-versa.

4.8 Análise dos dípteros como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país

4.8.1 Identificação dos espécimes coletados

A identificação de espécimes do gênero *Culicoides* baseia-se na sua morfologia, observando-se as características como por exemplo, asas, patas, genitália, cabeça, antena, palpus e tórax, contando com o auxílio de chaves dicotômicas como as seguintes: Forattini (1957); Wirth, Blanton (1959); Vargas (1960); Vitale, Wirth, Aitken (1981); Waller et al. (1990); Spinelli, Martinez (1991); Spinelli, Greiner, Wirth (1993); Brickle, Hagan (1999); Felipe-Bauer et al. (2003); Spinelli et al. (2005) e Perruolo (2009). Para

os espécimes do gênero *Aedes* as chaves taxonômicas específicas são as seguintes: Consoli & Oliveira (1998) e Forattini (2002). Para a identificação dos espécimes coletados, contamos com a colaboração do IZSAM e da Coleção de Ceratopogonidae da Fiocruz.

4.8.2 Identificação de arboviroses

Parte dos insetos coletados foram submetidos a RT-PCR em tempo real para detecção específica do ZIKV, utilizando-se o kit comercial Bio Gene Zika Virus PCR (Qiabasa®) e a uma RT-qPCR para detecção específica do BTV, segundo o manual da OMSA (2021).

5 RESULTADOS

Para identificar potenciais espécies participantes no ciclo de manutenção do ZIKV e sua possível relação com BTV e BVDV, bem como analisar dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culicoides* como transmissores do ZIKV, estabeleceu-se o diagnóstico laboratorial molecular (RT-qPCR).

5.1 Análise de ruminantes como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país

Para a pesquisa do RNA do ZIKV nas amostras, inicialmente foi realizada a padronização do kit comercial Bio Gene Zika Virus PCR (Qiabasa®). A eficiência de cada reação para a padronização bem como o slope podem ser visualizados nas Figuras 19 (A e B) e 20. Os resultados mostraram que o teste foi capaz de detectar até 2 cópias/mL.

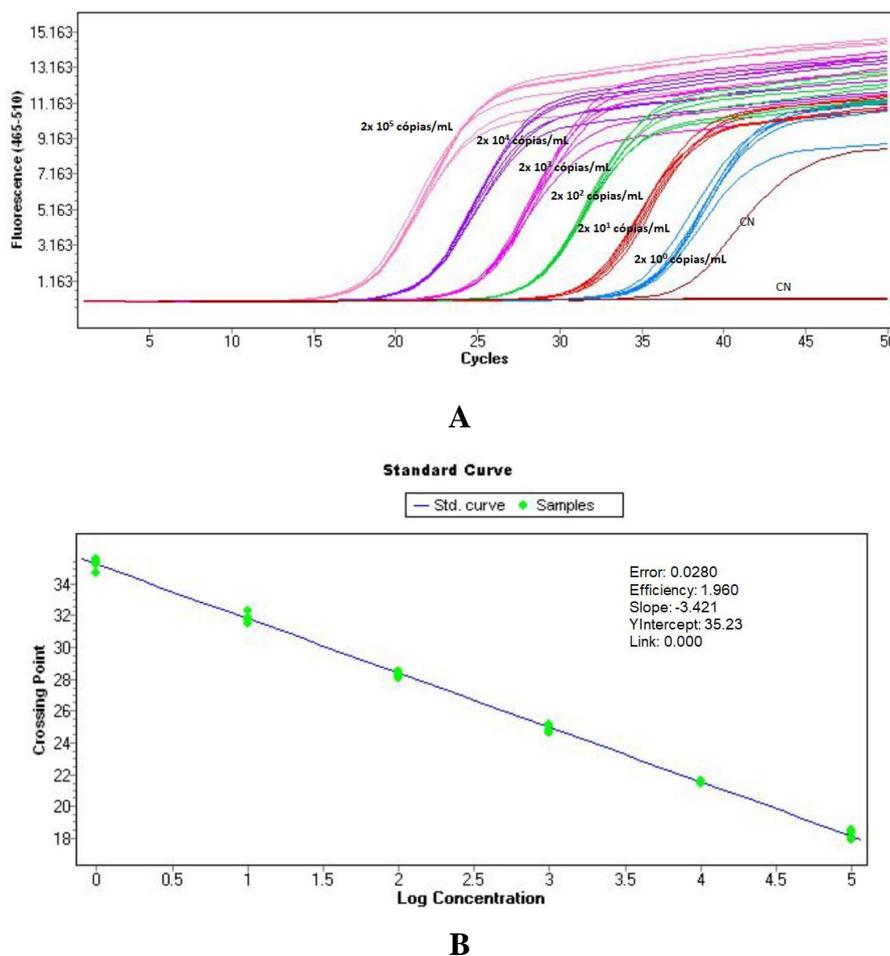


Figura 19 – Primeiro teste da RT-qPCR para vírus Zika (Qibasa®). **A)** Primeira curva de amplificação nas concentrações de 2×10^5 a 2×10^0 cópias/mL. **B)** Eficiência de reação em torno de 100%.

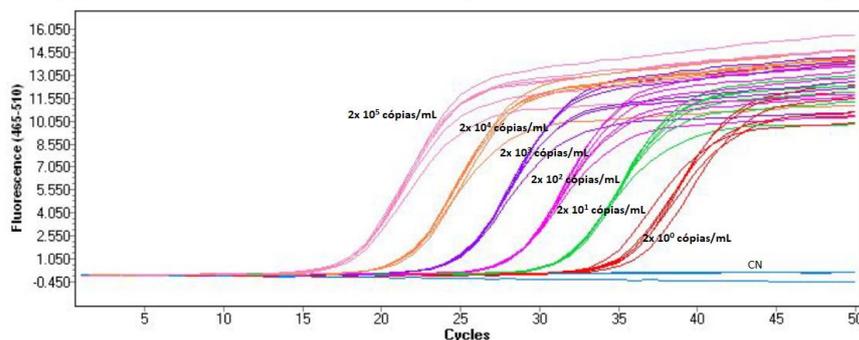


Figura 20 – Segundo teste da RT-qPCR para vírus Zika (Qibasa®) nas concentrações de 2×10^5 a 2×10^0 cópias/mL

Após a validação do kit comercial para detecção do ZIKV, as amostras de ruminantes foram submetidas a RT-qPCR. Foram analisadas 4326 amostras de bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos. Destas, três amostras de cervídeos mostraram-se positiva para o ZIKV, do qual duas eram da espécie *Blastocerus dichotomus* (Illiger, 1815) e uma *M. nana*. Ambas as espécies são consideradas, nacionalmente, como ameaçadas de extinção, na categoria de vulnerável (IUCN, 2021).

As amostras positivas, provenientes dos municípios de Jaboticabal (SP) e, Promissão (SP), foram selecionadas por conveniência do banco de amostras do LVB do ano 2018. As amostras positivas foram repetidas em triplicata, com Cts variando de 31 a 35 (Figura 21). De acordo com o relato do criador, um dos animais apresentou inapetência no período da colheita da amostra, porém como o animal apresentava problema dentário, não houve correlação com o resultado do teste molecular para ZIKV. Posteriormente, houve relato de natimortos. Infelizmente não houve envio de amostras desse natimorto para investigação de Zika.

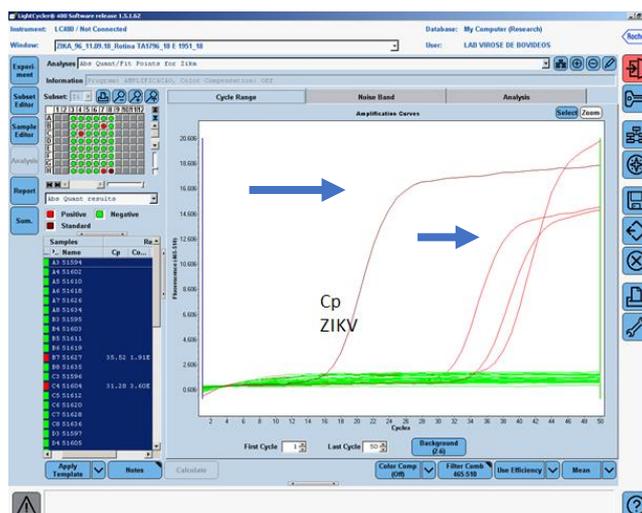


Figura 21 – Gráfico de quantificação de produto de PCR em termociclador em tempo real, para detecção do RNA do ZIKV. Seta maior: controle positivo. Seta menor: três amostras positivas para ZIKV.

Analisamos amostras de 98 cervídeos, as espécies estudadas e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3. Essas amostras eram provenientes dos municípios de Jaboticabal/SP, Promissão (SP) e Blumenau/SC.

Tabela 3. Resultados de RT-qPCR de ZIKV em cervídeos segundo a espécie.

Espécies	ZIKV			Total
	Negativo	Positivo	% Positivos	
<i>Blastocerus dichotomus</i> (Illiger, 1815)	25	2	7,4	27
<i>Mazama americana</i> (Erxleben, 1777)	7	negativo	0	7
<i>Mazama bororo</i> Duarte, 1996	35	negativo	0	35
<i>Mazama gouazoubira</i> G.Fischer, 1814	12	negativo	0	12
<i>Mazama nana</i> (Hensel, 1872)	9	1	10	10
<i>Mazama nemorivaga</i> (F.Cuvier, 1817)	1	negativo	0	1
<i>Odocoileus virginianus</i> (Zimmermann, 1780)	1	negativo	0	1
<i>Ozotoceros bezoarticus</i> (Linnaeus, 1758)	5	negativo	0	5
Total	95	3		98

Além das 98 amostras de cervídeos, em nosso estudo analisamos 3900 amostras de bovinos, 324 de ovinos e quatro caprinos, sendo 4074 amostras de sangue, três tecidos e 151 órgãos fetais. Nenhuma foi positiva para o ZIKV pela técnica de RT-qPCR. Essas amostras provêm de todas as regiões do Brasil.

As amostras positivas que detectamos em nosso estudo por apresentarem baixa carga viral não foram submetidas ao sequenciamento de nova geração.

5.2 Análise da interação do ZIKV com BTV e BVDV

5.2.1 Análise molecular do BTV e BVDV

As 4326 amostras que passaram pela técnica de RT-PCR para detecção do ZIKV, também foram submetidas à detecção do BTV e BVDV visto que são importantes patógenos responsáveis por perdas econômicas em rebanhos de todo o mundo, além de serem agentes causadores de sintomas clínicos parecidos com os que o ZIKV causam em humanos e por isso essa detecção pode ser importante como diagnóstico diferencial do ZIKV em ruminantes. Do total de amostras estudadas, 244 foram positivas para o BTV e sete para o BVDV (Figura 22).

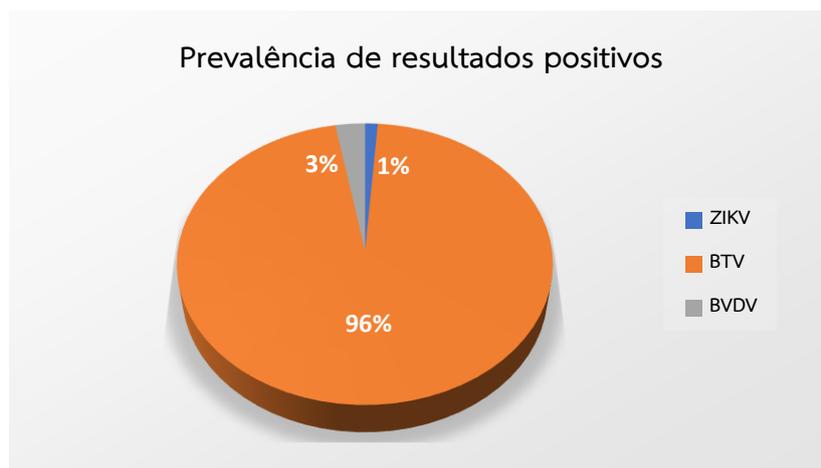


Figura 22 - Prevalência dos resultados positivos das amostras testadas para ZIK, BTV e BVDV.

As 244 amostras positivas para BTV pela técnica de RT-qPCR eram amostras de sangue, sendo 241 de bovinos e três de ovinos. As amostras de bovinos eram provenientes das coletas realizadas nos municípios de Andradina (91), Caraguatatuba (118) e Presidente Prudente (oito) do Estado de São Paulo, além de 24 amostras do município de Abaetetuba/PA que foram selecionadas do banco de amostras do LVB. Enquanto as amostras de ovinos eram do município de Blumenau/SC (Figura 23).

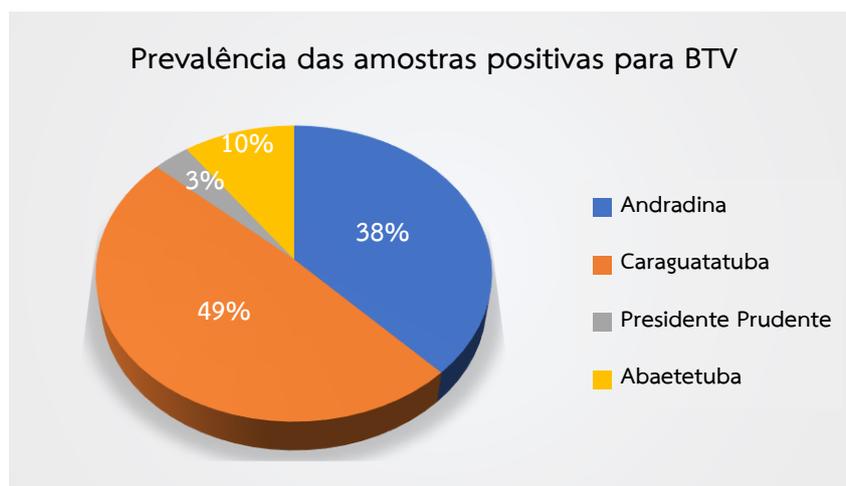
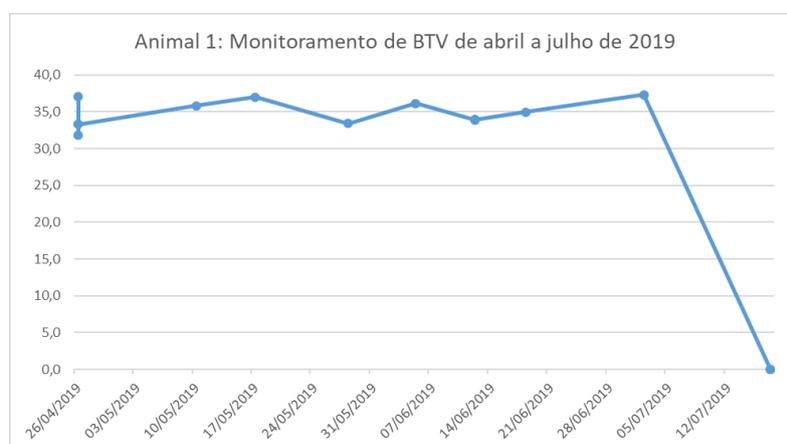


Figura 23 - Prevalência das amostras positivas testadas para BTV de acordo com sua origem.

Em uma propriedade de Presidente Prudente, após a detecção de animais positivos para língua azul, houve abertura por parte do criador para realizarmos o monitoramento desta enfermidade nos animais positivos pela RT-qPCR e a instalação de armadilhas para coleta de *Culicoides* onde os animais ficam albergados. A figura 24 apresenta os resultados do monitoramento de BTV.

Nota-se que na média, a detecção do RNA viral persistiu em torno dos três meses, com valores de Cp variando de 30 a 40, o que condiz com dados da literatura que no bovino, gira em torno de até 120 dias. Todos os animais positivos não apresentaram nenhum sintoma clínico condizente com doença vesicular ou reprodutiva e alterações hematológicas, demonstrando o papel do bovino como reservatório da doença. Nos bovinos, a faixa etária destes animais variou de 12 a 24 meses, fator de risco de infecção pelo vírus da língua azul, cuja principal forma de transmissão é pela picada de maruins infectados.



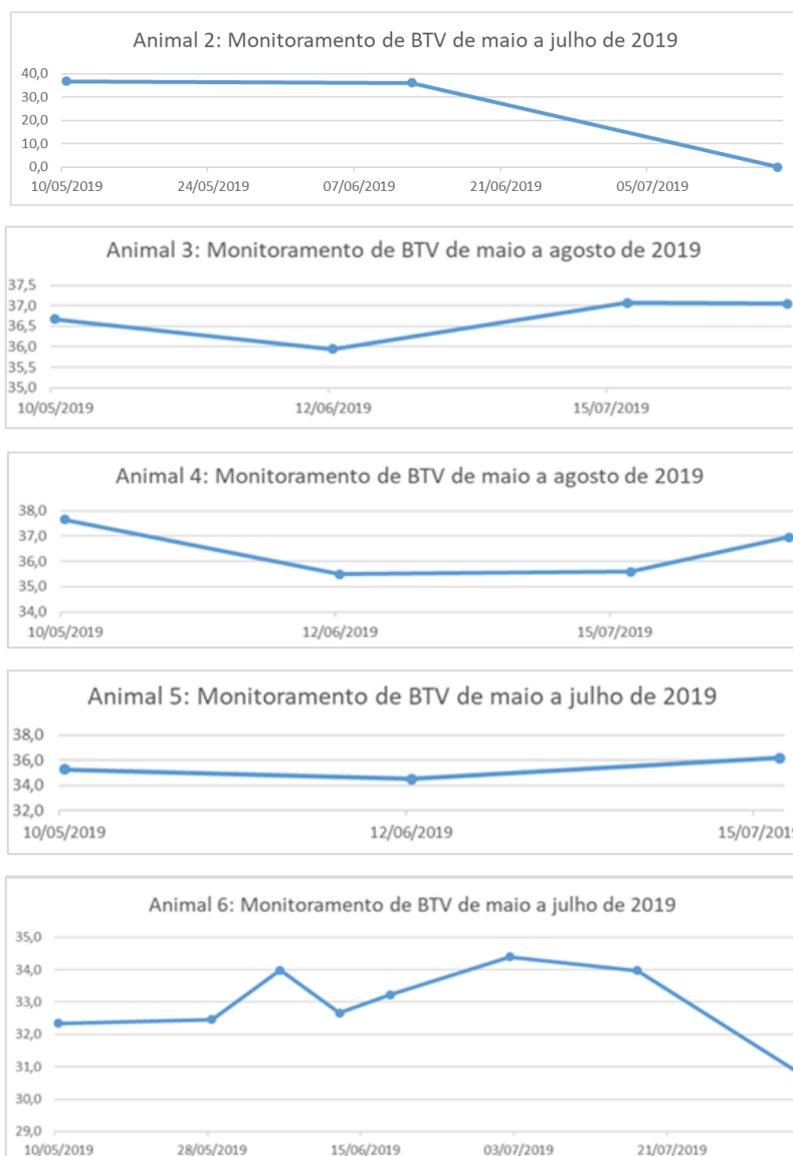


Figura 24 - Monitoramento da língua azul, em uma propriedade localizada em Presidente Prudente/SP.

As sete amostras positivas para BVDV eram amostras de bovinos, sendo duas amostras de sangue provenientes dos Estados de São Paulo e Paraná e cinco amostras de órgãos fetais provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo (Tabela 4).

Tabela 4 - Informações de origem das amostras positivas para BVDV.

Região	Estado	Município	Matriz	Espécie	BVDV
Sudeste	MG	Carneirinho	órgãos fetais	bovino	1
Sudeste	SP	Andradina	sangue	bovino	1
Sudeste	SP	Campinas	órgãos fetais	bovino	2
Sudeste	SP	Piracicaba	órgãos fetais	bovino	1
Sudeste	SP	São Paulo	órgãos fetais	bovino	1
Sul	PR	Curitiba	sangue	bovino	1

Total	7
-------	---

Das amostras de órgãos de fetos abortados utilizadas nesse estudo, cinco foram positivas para BVDV, no entanto, as amostras também foram submetidas a diagnóstico diferencial de doenças reprodutivas. Do total de amostras de fetos abortados, 11 (11/151) foram positivas para *Neospora caninum*, importante agente causador de perdas reprodutivas em animais domésticos impactando na rentabilidade dos sistemas de produção animal.

As amostras de cervídeos também foram analisadas para detecção do BVDV e BTV. Três destes cervídeos das raças *M. nana*, *M. bororo* e *O. bezoarticus* provenientes de um parque nacional de Blumenau/SC, foram encontrados mortos na mata do parque e com lesões hemorrágicas nos órgãos internos. A suspeita inicial era língua azul, mas os resultados foram negativos tanto para BTV, BVDV e ZIKV.

Dessa forma, tanto as amostras de cervídeos quanto as amostras de caprinos mostraram-se negativas nos ensaios realizados para BTV e BVDV.

Abaixo segue a tabela 5 contendo informações sobre os resultados positivos para ZIKV, BTV e BVDV encontrados nesse estudo. Nota-se que Andradina/SP foi o município onde foi detectado dois agentes de forma simultânea, BTV e BVDV, porém, não foram detectadas na mesma amostra.

Tabela 5 - Informações sobre as amostras positivas para ZIKV, BTV e BVDV.

Região	Estado	Município	Matriz	Espécies	Total	ZIKV	BTV	BVDV
Norte	PA	Abaetetuba	sangue	bovino	1795	neg	24	neg
Sudeste	MG	Carneirinho	órgãos fetais	bovino	1	neg	neg	1
Sudeste	SP	Andradina	sangue	bovino	711	neg	91	1
Sudeste	SP	Campinas	órgãos fetais	bovino	2	neg	neg	2
Sudeste	SP	Caraguatatuba	sangue	bovino	950	neg	118	neg
Sudeste	SP	Jaboticabal	órgãos fetais	bovino	2	neg	neg	neg
Sudeste	SP	Jaboticabal	sangue	cervídeo	51	3	neg	neg
Sudeste	SP	Piracicaba	órgãos fetais	bovino	5	neg	neg	1
Sudeste	SP	Presidente Prudente	sangue	bovino	22	neg	8	neg
Sudeste	SP	São Paulo	órgãos fetais	bovino	4	neg	neg	1
Sul	PR	Curitiba	sangue	bovino	1	neg	neg	1
Sul	SC	Blumenau	sangue	ovino	7	neg	3	neg
Total						3	244	7

5.2.2 Avaliação da reação cruzada entre ZIKV, BTV e BVDV

Os testes moleculares cruzados entre ZIKV, BVDV e BTV foram realizados, no sentido de avaliar possíveis resultados falso-positivos, devido ao estudo analisar agentes da mesma família (ZIKV e BVDV) bem como arboviroses (ZIKV e BTV). Portanto, o RNA viral das três doenças foi testado entre suas técnicas diagnósticas, como o RNA do vírus Zika que foi submetido a RT-qPCR para BTV e RT-PCR convencional bem como RT-qPCR para BVDV que é capaz de detectar os três genótipos (I, II e Hobi-Like) e vice-versa.

Conforme esperado, não se observou reatividade cruzada entre a RT-qPCR frente aos três agentes virais, pois o uso de sondas utilizadas na técnica de RT-qPCR, permite maior sensibilidade do teste diagnóstico, pois é necessário a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente.

Por outro lado, na RT-PCR para BVDV, cujo produto amplificado é visualizado na altura de 290 pb, o ZIKV apresentou banda na altura de 200 pb (Figura 25), o que alertou para possibilidade de estudos de ZIKV em amostras encaminhadas para diagnóstico de BVDV na rotina do laboratório. Desta forma, incluiu-se o estudo retrospectivo de fetos abortados para análise de ZIKV, cujos resultados foram negativos.

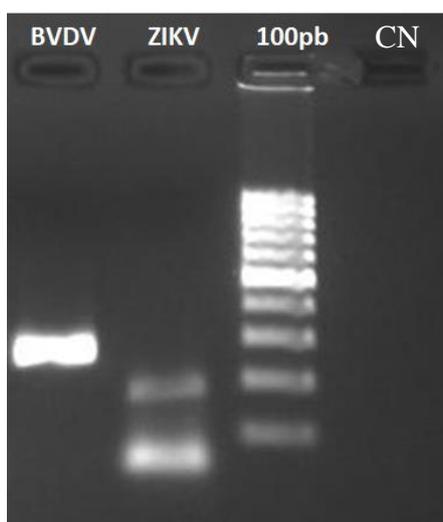


Figura 25 – Gel de agarose com concentração a 1,5% com produtos de PCR para BVDV. Coluna BVDV: BVDV com amplificação na altura dos 290pb. ZIKV: ZIKV com amplificação na altura 200pb. 100pb: Marcador molecular de 100pb. CN: Controle negativo.

5.3 Análise dos dípteros como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país

5.3.1 Identificação dos espécimes coletados

Nos locais onde as armadilhas foram instaladas, coletou-se mais mosquitos *Culicoides* que outras espécies de artrópodes, porém, não foi identificado mosquitos do gênero *Aedes*. Na comparação entre as duas armadilhas utilizadas nesse estudo, tipo CDC e a cedida pelo grupo da Itália, observou-se a captura de insetos maiores na armadilha tipo CDC, pois apresenta a malha da rede com espaçamento maior da utilizada na armadilha da Itália, o que dificultou a separação dos insetos menores.

As espécies de *Culicoides* identificadas estão citadas na tabela 5. Os espécimes que não se encontravam em perfeitas condições para o diagnóstico específico, foram identificados a nível de subgênero e grupo.

Tabela 6 - Espécies de *Culicoides* identificadas das coletas realizadas no Estado de São Paulo, de acordo com o subgênero ou grupo.

Subgênero/Grupo	Espécie
<i>Avaritia</i>	<i>C. pusillus</i> Lutz, 1913
<i>Haematomydium</i>	Espécie não identificada
<i>Haematomydium/paraensis</i>	Espécie não identificada
<i>Haematomydium/debilipalpis</i>	<i>C. debilipalpis</i> Lutz, 1913
<i>Hoffmania</i>	<i>C. brasilianum</i> Forattini, 1956 <i>C. diffusus</i> Spinelli, 1993 <i>C. foxi</i> Ortíz, 1950 <i>C. insignis</i> Lutz, 1913 Espécie não identificada
<i>Stilobezzia</i>	<i>C. venezuelensis</i> Ortíz, 1952
Unplaced, group <i>leoni</i>	<i>C. glabellus</i> Wirth & Blanton, 1956
Unplaced, group <i>fluvialis</i>	<i>C. leopoldoi</i> Ortíz, 1951
Unplaced, group <i>limai</i>	<i>C. limai</i> Barreto, 1944
Unplaced, group <i>reticulatus</i>	<i>C. pifanoi</i> Ortiz, 1951

5.3.2 Identificação de arboviroses

Para a identificação de arboviroses nos *Culicoides* coletados, os espécimes foram submetidos a RT-PCR em tempo real para detecção específica do ZIKV e a RT-qPCR para detecção específica do BTV. Todos os pools testados foram negativos para ambos os agentes.

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise de ruminantes como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país

O vírus Zika foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2015. Sua introdução no país tornou-se um importante problema de saúde pública global devido ao grande surto em seres humanos. Apesar do ZIKV ser de origem zoonótica, faltam informações sobre a transmissão, ou mesmo a exposição de vertebrados não humanos e mosquitos ao ZIKV (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2019). Dessa forma, aumentou a preocupação com a possibilidade de transbordamento do ciclo urbano para um ciclo silvestre, pois de acordo com o estudo realizado por Althouse e colaboradores (2016), é possível que o vírus Zika tenha potencial para estabelecer um ciclo de transmissão silvestre nas Américas.

Kuno e Chang (2005) através da associação de fontes animais com linhagens virais sugeriu que o ZIKV se dispersou amplamente entre espécies animais distintas sem um padrão claro de preferência, talvez associado ao ciclo enzoótico do ZIKV na África, cujo ciclo natural permite uma ampla gama de hospedeiros. No entanto, pouco se sabe sobre os hospedeiros vertebrados que participam da manutenção desse vírus em natureza. Alguns estudos têm contribuído para este entendimento, mas ainda são incipientes diante da complexidade dos ciclos de transmissão e da escassez de informação (KARABATSOS, 1985; KUNO et al., 2017; DIAS, 2019).

Nesse contexto, o presente estudo foi realizado durante o período de 2017 a 2020, a partir da análise de 4326 amostras clínicas de vertebrados domésticos como bovinos, ovinos e caprinos, e vertebrados silvestres como cervídeos, a fim de identificar potenciais espécies participantes no ciclo de manutenção do ZIKV no país. O vírus Zika foi detectado em três amostras de cervídeos, evidenciando um percentual de detecção de 0,07% (3/4326) do total de amostras analisadas, e uma frequência de 3,0% (3/98) no total de amostras de cervídeos analisadas. De acordo com dados informados pelas Secretarias Municipais de Saúde no Sistema de Informação Sinan Net, não houve registro de caso humano de Zika em 2018 (CVE, 2019).

Esse resultado sugere que os cervídeos foram expostos ao ZIKV e são susceptíveis à infecção, e por isso devem ser motivo de atenção, pois, de acordo com Drolet e

colaboradores (2013), os cervos podem servir como reservatórios de amplificação de vírus a outras espécies animais, selvagens e domésticas. Os cervídeos detectados positivos para ZIKV eram de espécies consideradas, nacionalmente, como ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (IUCN, 2021). De acordo com Duarte e colaboradores (2012) algumas espécies de cervídeos tem sofrido grande pressão antrópica decorrente da perda de seu habitat, principalmente após a expansão urbana e agrícola, em áreas até então conservadas, o que aproximou o homem com seus animais domésticos dos animais silvestres, possibilitando a disseminação de doenças a novos hospedeiros e ambientes (HOLSBACK et al., 2013).

A infecção pelo ZIKV em humanos, em cerca de 75% a 80% dos casos, apresenta-se de forma assintomática (ATIF et al., 2016). Após um período de incubação de aproximadamente 3 a 12 dias, a manifestação mais comum é caracterizada por quadro autolimitante de febre baixa, cefaleia, dores musculares, dores articulares nas pequenas articulações das mãos e pés, conjuntivite não purulenta, dor ocular, prostração e rash maculopapular pruriginoso (YADAV; RAWAL; BAXI, 2016; ATIF et al., 2016; AZIZ et al., 2017). Embora a doença tenda a evoluir de forma favorável (ZANLUCA et al., 2015), o vírus tem sido associado a malformações congênitas, incluindo microcefalia e outras doenças neurológicas graves, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU et al., 2016). Um dos cervídeos analisados apresentou inapetência no período da colheita da amostra, porém, foi associado com problema dentário, entretanto, posteriormente, houve relato de natimortos, infelizmente não houve envio de amostras desse natimorto para investigação de Zika. De acordo com Catenacci e Alcântara (2018), quase não há informações sobre os sinais clínicos da infecção do ZIKV em animais selvagens, pois a ocorrência de infecção pelo vírus Zika em animais selvagens foi encontrada principalmente de forma acidental durante pesquisas sorológicas em busca de outros patógenos.

Segundo Bueno e colaboradores (2016) mamíferos selvagens com infecção pelo ZIKV aparentemente apresentam poucos sinais clínicos. Em um estudo sentinela em Uganda em 1947, um primata apresentou pirexia leve (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Em estudos experimentais macacos rhesus infectados com ZIKV mostraram inapetência leve a moderada, o que resultou em perda de peso leve em quatro animais (DUDLEY et al., 2016). Dois animais também desenvolveram uma erupção cutânea leve

ao redor do local de inoculação em 1 DPI que persistiu por 4-5 dias. Nenhum outro sinal clínico anormal foi observado. Outros dois estudos com macacos rhesus mostraram que dentro de 8-10 DPI os animais apresentaram febre (temperatura axilar 38,9 °C) com temperatura máxima de 40,1 °C (DUDLEY et al., 2016) e 39,5 °C (OSUNA et al., 2016).

Uma limitação de nosso estudo inclui um número limitado de amostras de cervídeos, pois os cervos neotropicais exibem comportamento elusivo e não toleram o contato humano e tais características impossibilitam a obtenção de amostras biológicas, como sangue, tecido ou células em geral (SILVA; OLIVEIRA; DUARTE, 2020). Entretanto, um dos pontos fortes do nosso estudo é o uso do método molecular altamente sensível e específicos com critérios conservadores de positividade para detecção da infecção pelo ZIKV. Hayes (2009) relata que os testes moleculares para detecção de ZIKV, incluindo PCR em tempo real, são a melhor opção para detectar RNA de ZIKV. Os testes podem ser realizados em amostras de soro de fase aguda, tecidos ou sangue total, obtidas menos de sete dias após o início da doença.

Pelo menos 79 espécies animais foram identificadas como naturalmente infectadas ou experimentalmente suscetíveis à infecção por ZIKV. Mamíferos, e especialmente primatas, são o grupo taxonômico mais representado, embora aves, répteis e anfíbios também tenham sido identificados, indicando a diversidade potencial de hospedeiros de ZIKV e a falta de uma associação clara entre ZIKV e táxons animais específicos. Outros trabalhos também obtiveram resultados positivos para detecção de ZIKV pela técnica de PCR em tempo real em animais silvestres e domésticos. Favoretto e colaboradores (2016) relataram a primeira detecção do ZIKV entre primatas neotropicais, pela técnica de PCR em tempo real. Sete animais (29%) foram positivos para o ZIKV, sendo quatro saguis (*Callithrix jacchus*) e três macacos (*Sapajus libidinosus*). O sequenciamento do produto amplificado de um dos macacos mostrou semelhança de 100% com ZIKV circulando em humanos na América do Sul. Vale ressaltar que os saguis eram de vida livre, porém, mantinham contato com humanos, enquanto os macacos eram em sua maioria, animais de estimação, sugerindo que os animais poderiam atuar como hospedeiros do ZIKV.

Ragan e colaboradores (2017) buscaram identificar potenciais espécies animais reservatórios e/ou hospedeiros amplificadores na América do Norte que poderiam

sustentar o ciclo de transmissão do ZIKV. Através de infecção experimental eles identificaram RNA do ZIKV em sapos e tatus.

Estudo recente de Pauvolid-Corrêa e colaboradores (2019) analisou amostras de vertebrados domésticos e silvestres da região centro-oeste do Brasil visando à detecção de ZIKV. Entre as espécies analisadas, 177 eram bovinos, 170 ovinos, 189 equinos e 190 caninos, porém nenhuma amostra foi positiva. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, em que 3.900 bovinos, 324 ovinos, 95 cervídeos, 4 caprinos, testaram negativo para o RNA do ZIKV. Esses resultados podem sugerir que não há transmissão ativa do ZIKV entre essas espécies animais no período de 2011 a 2020, nas regiões estudadas, portanto, improváveis de representar risco como reservatório do vírus Zika.

Nossos resultados também corroboram com o trabalho de Ragan e colaboradores (2017) que não detectaram o RNA do ZIKV em animais domésticos como bezerras, suínos, cabras e galinhas. Da mesma forma, recentemente, o estudo de Ambagala e colaboradores (2020) através de inoculação experimental de ZIKV em ovinos, bovinos, suínos e galinhas, obtiveram resultados negativos para detecção do vírus Zika.

No presente estudo analisamos fetos de bovinos, ovinos e caprinos, mas não detectamos o RNA de ZIKV em nenhuma das amostras. Todavia, apesar dos nossos resultados negativos, o vírus Zika tem sido capaz de infectar fetos de várias espécies, incluindo suínos (DARBELLAY et al., 2017a), frangos (THAWANI et al., 2018; ZHANG et al., 2019; AMBAGALA et al., 2020), camundongos (CUGOLA et al., 2016; YOCKEY et al., 2016), macaco rhesus (NGUYEN et al., 2017) e humanos (MLAKAR et al., 2016).

Dois estudos com fetos de suínos e suínos neonatais demonstraram que ambos são altamente suscetíveis à infecção pelo vírus Zika, indicando que a idade do animal pode ser um fator importante para a infecção pelo vírus Zika (DARBELLAY et al., 2017a; DARBELLAY et al., 2017b). Embriões de frango foram inoculados experimentalmente com ZIKV em diferentes estudos e apresentaram-se altamente suscetíveis ao vírus, sendo o material genômico viral detectado por RT-PCR em tempo real no cérebro, olho, coração e fígado, variando a detecção aos dias 7 a 15 após a inoculação, além do ZIKV suprimir

o desenvolvimento dos embriões (THAWANI et al., 2018; ZHANG et al., 2019; AMBAGALA et al., 2020).

Recentemente foi demonstrado que tanto os macacos rhesus quanto os *cinomologus* são altamente suscetíveis à infecção pelo ZIKV em condições experimentais e que o RNA do vírus Zika poderia ser detectado no cérebro desses animais, linfonodos e tecido reprodutivo com RNA do vírus Zika em estágios finais de infecção (28 dias após a infecção) (OSUNA et al., 2016).

Iani (2021) cita a necessidade de monitoramento ativo de reservatórios e hospedeiros animais para caracterizar agentes infecciosos e o risco de exposição da comunidade, principalmente em países com históricos de surtos de transmissão zoonótica como o Brasil. O avanço tecnológico de plataformas de sequenciamento de nova geração tornou viável a geração de genomas virais, desempenhando um papel importante na luta contra epidemias emergentes e reemergentes (FARIAS et al., 2016). Pois os genomas analisados permitem caracterizar a diversidade genética viral, reconstruir as origens da epidemia, estimar as taxas de transmissão, sugerir próximos surtos e fornecer informações para o desenvolvimento de vacinas e novos medicamentos, bem como melhoramento dos métodos diagnósticos sorológicos e moleculares (Farias et al., 2016).

Entretanto, é importante considerar que ao longo de todo o processo, desde a coleta de amostra até o sequenciamento, existem alguns fatores que podem desempenhar um papel fundamental e, conseqüentemente, alterar os resultados finais. No caso do Zika vírus, devido aos baixos títulos virais no sangue, o sequenciamento torna-se um grande desafio (POUR, 2018). A carga viral da amostra pode ser observada de acordo com o valor de Ct fornecido pela RT-qPCR, sendo o valor de Ct inversamente proporcional a carga viral. Esses valores são utilizados para selecionar as amostras com maior quantidade do vírus, pois isso aumenta a chance de o procedimento ser bem-sucedido. As amostras com Cts acima de 30, como as encontradas em nosso estudo (Cts 31 a 35), contém baixos títulos virais, o que torna um fator complicador para o sequenciamento. Vários estudos mostraram uma redução no sucesso de várias análises de sequenciamento em amostras com Cts maiores de 30 (POUR, 2018; THEZÉ et al., 2018; CHARRE et al., 2020; de MELLO MALTA et al., 2021). Iani (2021) indica que para amostras com Cts acima de 24 há a necessidade de fazer algum enriquecimento, como o isolamento viral.

Outro fator relevante é o fato da limitação das amostras em se tratando de amostras clínicas, pois para a detecção de infecção aguda do ZIKV seria necessário a coleta de amostra de sangue durante o período virêmico, que normalmente é curto mesmo nos hospedeiros amplificadores. Catenacci e Alcântara (2018) indicaram que os testes moleculares para detecção de ZIKV, devem ser realizados em amostras obtidas com até sete dias após o início da doença. Contudo, os cervos neotropicais exibem comportamento elusivo e não toleram o contato humano e tais características dificultam a obtenção de amostras biológicas. Além disso, muitos desses animais poderiam participar apenas como hospedeiros terminais em ciclos abortivos de transmissão, apresentando uma viremia ainda mais curta e com baixa carga viral tornando ainda mais difícil a detecção de RNA viral na corrente sanguínea (DIAS, 2019) e conseqüentemente seu sequenciamento.

Neste caso, técnicas sorológicas de pesquisa de anticorpos talvez se apresentem como uma valiosa ferramenta, uma vez que teriam a capacidade de evidenciar infecções passadas (DIAS, 2019). Um estudo realizado por Reuter e Nelson (2018), no qual amostras sorológicas de 22 cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) residentes na ilha de St. John, do Parque Nacional das Ilhas Virgens nos Estados Unidos, foram rastreadas para patógenos virais importantes, incluindo o ZIKV. Pelo teste de neutralização por redução de placa foi observada a presença de anticorpos anti-ZIKV em quatro cervos, sugerindo possível exposição dos cervídeos ao ZIKV.

Entre as 570 amostras de sangue de bovinos coletadas em Andradina/SP no ano de 2018, 529 foram submetidas à técnica de vírusneutralização (VN) para pesquisa de anticorpos anti-ZIKV. Conforme relatado por Freire e colaboradores (2021), das 529 amostras submetidas à técnica de vírusneutralização, 53 foram reagentes ao ZIKV. Esses resultados sugerem que os bovinos foram de fato expostos ao ZIKV e são suscetíveis à infecção do ZIKV. Os animais eram criados em sistemas extensivos e agrossilvipastoril, que a maior prevalência de bovinos reagente para ZIKV (12%) eram do sistema de criação agrossilvipastoril. De acordo com Freire e colaboradores (2021) as características desse sistema de criação podem ter sido responsáveis por um maior contato animal/vetor e conseqüentemente uma maior soroprevalência neste sistema.

Apesar da ausência de detecção do RNA viral nas amostras de bovinos testadas, as evidências sorológicas reportadas no estudo por Freire e colaboradores (2021) são achados importantes. De acordo com Dias (2019), evidências sorológicas eventuais

reportadas em investigações ativas podem indicar precocemente a circulação viral durante períodos de baixa circulação viral em ausência de epidemias e epizootias. Esses resultados são semelhantes a outros estudos que detectaram anticorpos para o vírus Zika em animais domésticos e silvestres.

Um estudo no Quênia em 1977 se concentrou no papel potencial de vertebrados domésticos (cabras, ovinos e bovinos) e vertebrados selvagens (2.424 pequenos mamíferos, 1.202 aves, 18 répteis) na manutenção da transmissão de arbovirose. Os ensaios de inibição da hemaglutinação mostraram que animais domésticos (0,4%), aves silvestres (0,4%), pequenos mamíferos silvestres (5,9%) e répteis (27,7%) testado positivo para ZIKV (JOHNSON et al., 1977).

Em Lombok, Indonésia, em 1978, anticorpos anti-ZIKV foram detectados em patos, cabras, vacas, cavalos, bisões e búfalos carabaos, mas não em galinhas, ratos ou aves selvagens, indicando a ampla circulação do vírus em animais domésticos (OLSON et al., 1983). Enquanto outros estudos relataram anticorpos ZIKV em animais como cabras, ovelhas e roedores (DARWISH et al., 1983), leões e ungulados como Artiodactyla, Perissodactyla e Proboscidea (HENDERSON; HEWITT; LULE, 1968).

Barr, Anderson e Long (2016) infectaram culturas de células de diferentes espécies animais com ZIKV, 17 mostraram que eram suscetíveis ao vírus, desenvolvendo um efeito citopático sete dias após a infecção. Algumas das culturas celulares eram de animais domésticos e outras de primatas selvagens do Velho Mundo, enquanto nove eram de espécies de animais selvagens encontradas nas Américas: *T. brasiliensis*, *S. floridanus*, *U. cinereoargenteus*, *O. hemionus*, *P. lotor*, *D. virginiana*, *D. novemcinctus*, *M. monax* e *N. vison*. A maioria destes animais são peri-domésticos e sinantrópicos. Os autores também argumentaram que, com viremia suficientemente alta, esses animais poderiam servir como hospedeiros. No entanto, eles também indicaram que a estirpe do vírus utilizada no experimento não possui algumas características do ZIKV atualmente circulante no campo e que o vírus no laboratório não reflete a infecção natural.

Chua e colaboradores (2019) testaram 234 amostras de macacos de cauda longa selvagens (*Macaca fascicularis*) capturados na Malásia Peninsular em 2009, 2010 e 2016 para RNA e anticorpos do vírus Zika. Nenhum foi positivo para RNA, no entanto, 1,3% foram soropositivos para ZIKV. Enquanto Dias (2019) analisou um total de 174 amostras

de plasma por PRNT90 para ZIKV, resultando na detecção de 7 (4%) amostras soropositivas. Cinco espécies compõem o grupo dos soropositivos, sendo três (n=22) capivaras, um (n=3) morcego, um (n=37) quati, um (n=21) gambá e um (n=1) PNH. O estudo sugeriu a exposição desses hospedeiros ao vírus Zika, sendo a primeira evidência sorológica da circulação do ZIKV nessas espécies nos Brasil.

A presença de animais soropositivos para o ZIKV indica exposição prévia ao agente, ou seja, passou a fase de viremia e possível transmissão viral para o inseto artrópode (vetor). Porém, mais estudos são necessários para entender adequadamente o papel dos vertebrados na transmissão dinâmica do ZIKV (HAYES, 2009; VOROU, 2016; BUENO et al., 2016; CATENACCI; ALCÂNTARA, 2018).

Apesar da expressiva redução da incidência da infecção pelo ZIKV nos últimos anos (CVE, 2019), acredita-se que o vírus tenha potencial para se manter circulando em ciclos enzoóticos silenciosos no país, como se observa com o YFV, com eventuais reemergências resultando em epidemias (BRASIL, 2017, 2018). Como observado para o DENV, a massiva epidemia da febre do Zika pode ter produzido uma grande parcela da população imunizada pela primo-infecção. A recrudescência da circulação viria quando uma nova parcela da população estiver susceptível, gerando uma nova onda epidêmica. Nos períodos interepidêmicos, o vírus ficaria sendo mantido em ciclos inaparentes de circulação em espécies de vertebrados e invertebrados (KUNO et al., 2017).

Um fator crítico para o desenvolvimento de estratégias de saúde pública para mitigar o risco de doença humana contínua de ZIKV é se um ciclo silvestre de transmissão ZIKV provavelmente se estabelecer na América do Sul, como ocorreu séculos atrás para o vírus da febre amarela após sua importação da África, pois dessa forma o controle do mosquito e mesmo a imunidade de rebanho pela vacinação ou a limitação da transmissão pela rotatividade demográfica não serão suficientes para erradicá-lo da região (ALTHOUSE et al., 2016). Existem vários fatores que podem contribuir para o potencial de transmissão enzoótica do ZIKV (por exemplo, vetores suscetíveis, densidade vetorial, proximidade com humanos com infecção por ZIKV e fatores ambientais) (TERZIAN et al., 2018), além da ampla diversidade de possíveis hospedeiros tanto silvestres como domésticos, e a sua suscetibilidade à infecção por ZIKV e a duração da viremia que geram permanecem desconhecidos e potencialmente um dos fatores mais importantes (ALTHOUSE et al., 2016).

Althouse e colaboradores (2016) realizaram um estudo de modelagem matemática para prever se há potencial para o vírus Zika estabelecer um ciclo de transmissão silvestre nas Américas, baseado na dinâmica de transmissão silvestre do DENV e YFV. Após o estabelecimento de simulações, o estudo sugeriu que há uma alta probabilidade de estabelecimento desse ciclo silvestre, no entanto, a probabilidade depende de uma série de parâmetros biologicamente plausíveis, como tamanho populacional de hospedeiros e vetores, taxas de natalidade hospedeiras e força de infecção ZIKV.

A amostragem por conveniência realizada nesse estudo ocorreu por uma questão logística e não epidemiológica, porém, não se descarta a importância e a confiabilidade da pesquisa, pois pudemos analisar amostras provenientes de todas as regiões brasileiras, possibilitando uma visão geral da ocorrência do ZIKV no país. Apesar dos nossos resultados positivos, esses achados não definem a real participação de cervídeo no ciclo de transmissão do vírus ZIKV, bem como dos outros ruminantes domésticos analisados. Nesse sentido, para entender o papel que o ruminante desempenha na manutenção e expansão do ciclo de transmissão do ZIKV na natureza, estudos de campo e experimentais para análise da competência do hospedeiro e vetorial, bem como a dinâmica da interação vírus-hospedeiro e vírus-vetor, pesquisas sorológicas e vigilância ativa, devem ser realizados como forma de auxiliar a interpretação dos dados obtidos nessas investigações, pois podem ser úteis na definição de medidas efetivas no controle dessa arbovirose.

6.2 Análise da interação do ZIKV com BTV e BVDV

BTV

Apesar de distintos, o ZIKV e o BTV apresentam certas características epidemiológicas e manifestações clínicas em comum. Ambas são arboviroses e causam malformações congênitas, abortos e natimortos. A Língua Azul é uma doença infecciosa não contagiosa que apresenta importantes impactos sócio-econômicos decorrentes de restrições na importação ou por perdas diretas nos rebanhos infectados com o vírus da língua azul. Assim como ocorre com o vírus Zika, o BTV é um arbovírus, porém, transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*.

No presente estudo as 4326 amostras foram submetidas para detecção do vírus da língua azul, destas, 244 (5,6%) foram positivas para o BTV, todas eram de bovinos, provenientes dos municípios de Andradina, Caraguatatuba, Presidente Prudente, do Estado de São Paulo e do município de Abaetetuba do Estado do Pará.

Bovinos infectados com BTV costumam ser assintomáticos e apresentam longo período de viremia, servindo como reservatórios, infectando os vetores que transmitem o vírus a outros vertebrados. Em bovinos, o vírus é detectado no sangue por 35 a 60 dias após a infecção, durando até 160 dias (KATZ et al. 1994), enquanto os ovinos são mais suscetíveis, pois manifestam os sintomas com maior gravidade. Nossos resultados corroboram com essas informações pois os bovinos positivos para BTV que foram monitorados em Presidente Prudente/SP, não apresentaram nenhum sintoma clínico e a média de detecção viral persistiu em torno de três meses.

Estudos sorológicos para BTV realizados no Brasil em ruminantes domésticos (bovinos, ovinos, caprinos e búfalos) indicam que a infecção está amplamente distribuída em todas as regiões, incluindo a Paraíba (MELO et al. 2000; ALVES et al. 2009), Pernambuco (MOTA et al. 2011), Bahia (SOUZA et al. 2010), Minas Gerais (CASTRO et al. 1992; LAGE et al. 1996; KONRAD et al. 2003), São Paulo (NOGUEIRA et al. 2009; VENDITTI, 2009; NOGUEIRA et al., 2016; KAWANAMI, 2018; SILVA et al., 2018), Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2006), Paraná (NEGRI FILHO, 2015; SBIZERA, 2018; SBIZERA et al., 2020) e Mato Grosso do Sul (PELLEGRIN et al. 1997).

BVDV

A família *Flaviviridae* contempla, além do vírus Zika, outros vírus que causam sintomatologia relacionados a doença reprodutiva, como é o caso do BVDV, é considerado, em todo o mundo, um dos mais importantes patógenos para os rebanhos bovinos (RIDPATH; FLORES 2007). A sua capacidade de cruzar a barreira placentária durante a gestação pode causar infertilidade temporária, queda nas taxas de concepção, morte embrionária e abortamentos (VIRAKUL et al., 1988; HOUE; PEDERSEN; MEYLING, 1993), mumificação fetal e natimortalidade (McCLURKIN et al., 1984; BROWNLIE; CLARK; HAWARD, 1989; QUINCOZES et al., 2007).

Em nosso estudo sete amostras (0,16%) apresentaram-se positivas para detecção do RNA de BVDV. No Brasil, a infecção pelo BVDV está amplamente disseminada tanto nos rebanhos bovinos de leite, quanto nos de corte (QUINCOZES et al., 2007) onde os isolados virais foram caracterizados geneticamente e identificados como pertencentes às espécies BVDV 1 e 2 (FLORES et al., 2005; CORTEZ et al., 2006; LUNARDI et al., 2008). Nossos resultados corroboram com Pilz e colaboradores (2007), ao detectarem 23 animais positivos pela técnica de PCR, e com Dezen e colaboradores (2013), onde 692 amostras de soro de bovinos foram testadas para RNA de BVDV, em 29 (4,19) foram detectados. Em um estudo mais recente, O BVDV foi detectado em 1% (29/2864) das amostras de bovinos (SPETTER et al., 2020).

Os efeitos reprodutivos da infecção aguda por BVDV incluem taxas de fertilidade reduzidas, morte embrionária, abortos e defeitos congênitos (SPRECHER et al., 1991; MCGOWAN et al., 1993). Efeitos condizentes com o encontrado em nosso estudo pois detectamos o RNA viral em fetos de bovinos abortados. Outro estudo realizado em fetos, foi o de Botton e colaboradores (1998), que detectaram 0,79% (11 fetos) de fetos positivos.

A ocorrência de falhas reprodutivas, principalmente abortamentos, natimortos e malformações, além do nascimento de bezerros fracos e inviáveis, é um indicativo da presença do BVDV nos rebanhos (FLORES et al., 2005).

Em nosso estudo, dos ovinos analisados nenhum foi positivo para o BVDV. No entanto, em um estudo realizado por Gaeta e colaboradores em 2016, foi detectado a prevalência de 1% de ovinos positivos para BVDV no Estado de São Paulo. A criação consorciada de ovinos e bovinos pode ser um fator de risco na transmissão de BVDV para ovinos, fato observado por Gaeta et al. (2016) e por Krametter-Froetscher et al. (2010), demonstrando que os pestivirus de ruminantes não são necessariamente hospedeiros-específicos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Embora as frequências de infecção por pestivirus sejam baixas em rebanhos ovinos (GAETA et al., 2016), diversos estudos indicam que os rebanhos bovinos apresentam alta prevalência (SAMARA et al., 2004; POLLETO et al., 2004; QUINCOZES et al. 2007, FRANDOLOSO et al., 2008; BRITO et al. 2010, CHAVES et al. 2012; SOUZA et al., 2013). Contradizendo a informação supracitada, outros estudos

(MIRANDA, 2012; POSSEBON; MARTINS, 2014; WEBER et al., 2014; BASQUEIRA et al., 2017) encontraram baixa prevalência nos rebanhos bovinos. Em nosso estudo o RNA viral foi detectado em 0,16% das amostras analisadas. De acordo com Baker (1995), embora aparentemente baixa, a prevalência de animais virêmicos observada é suficiente para manter o vírus na população.

As divergências nos estudos soropidemiológicos sobre a prevalência desta doença em rebanhos bovinos, de acordo com Nogueira (2003) podem ser explicadas por diversos fatores, entre eles a densidade bovina, tamanho do rebanho e manejo. Seja para diagnosticar casos clínicos, estabelecer prevalência de doenças em rebanhos ou regiões e detectar animais aparentemente normais, mas persistentemente infectados, é vital detectar com precisão o BVDV (LANYON et al., 2014). Diante desse cenário, o RT-PCR se mostra um dos métodos mais sensíveis para a detecção de BVDV (HOOFT van IDDEKINGE et al., 1992; HORNER et al., 1995).

Os ensaios de RT-PCR em tempo real, do qual utilizamos em nosso estudo, são recomendados pela OMSA (2018) como técnica padrão para a detecção de RNA viral de BVDV, visto que a técnica apresenta vantagens como alta sensibilidade, não depende do uso de cultura de células, é capaz de detectar genoma de vírus não infeccioso, além de ser rápida, confiável e permitir a detecção do RNA viral em uma ampla gama de amostras, incluindo soro, sangue total, tecidos, leite e sêmen.

Diversos autores citam em seus estudos o uso da RT-PCR como uma estratégia adequada para o diagnóstico etiológico da infecção pelo BVDV (KIM; DUBOVI, 2003; LARSKA; KUTA, POLAK, 2013; WEBER et al., 2014) consolidando o que é preconizado pela OMSA. O mesmo indicado para detecção do BTV, em que testes de reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) são amplamente utilizados para identificar o RNA viral em amostras clínicas e onde também é possível identificar o sorotipo (CFSPH, 2015).

Interação entre BTV, BVDV e ZIKV

Os testes moleculares cruzados entre ZIKV, BVDV e BTV foram realizados, no sentido de avaliar possíveis resultados falso-positivos, devido ao estudo analisar agentes da mesma família (ZIKV e BVDV) bem como arboviroses (ZIKV e BTV). Portanto, o

RNA viral das três doenças foi testado entre suas técnicas diagnósticas, como o RNA do vírus Zika que foi submetido a RT-qPCR para BTV e RT-PCR convencional bem como RT-qPCR para BVDV que é capaz de detectar os três genótipos (I, II e Hobi-Like) e vice-versa.

Conforme esperado, não se observou reatividade cruzada entre a RT-qPCR frente aos três agentes virais, pois o uso de sondas utilizadas na técnica de RT-PCR convencional ou RT-qPCR, permite maior especificidade do teste diagnóstico, pois necessário a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente.

Nosso trabalho fornece informações importantes que podem auxiliar no estabelecimento de ferramentas de diagnóstico corretas e programas de controle, pois contribui para o conhecimento sobre a circulação de BTV e BVDV não apenas em bovinos, como também em outras espécies de ruminantes suscetíveis à infecção desses agentes.

6.3 Análise dos dípteros como participantes do ciclo de manutenção do ZIKV no país

Ambos os grupos de dípteros, *Aedes* e *Culicoides*, são vetores de doenças de relevância médica e veterinária para humanos e animais domésticos no Brasil (GONZALES et al., 2020). Em nosso estudo capturamos apenas dípteros do gênero *Culicoides*.

O gênero *Culicoides* contém mais de 1.300 espécies (BORKENT; DOMINIAK, 2020) e ocorre em todo o mundo, exceto na Antártica, Nova Zelândia e outras áreas isoladas (MELLOR et al. 2000). Dessa forma, o desenvolvimento de programas de amostragem para *Culicoides* pode ser desafiador devido à variação na ecologia e comportamento das numerosas espécies, bem como suas amplas distribuições e habitats (MCDERMOTT; LYSYK, 2020).

Em nosso estudo, um total de 14 espécies de *Culicoides* foram coletadas: *C. pusillus*, *C. debilipalpis*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. brasilianum*, *C. diffusus*, *C. venezuelensis*, *C. leopoldoi*, *C. glabellus*, *C. limai*, *C. pifanoi*, *C. (Haematomyidium)*, *C. (guttatus)*, *C. (paraensis)*.

Em um estudo realizado recentemente, Gonzáles e colaboradores (2020), capturaram cerca de 15 espécies de *Culicoides* em Araçatuba, região oeste de São Paulo. O presente estudo corrobora parte desses resultados, pois detectamos as seguintes espécies em comum, *C. leopoldoi*, *C. limai*, *C. venezuelensis*, *C. pusillus*, *C. foxi*, *C. debilipalpis*, *C. (paraensis)*. Porém, as espécies mais abundantes encontradas por Gonzáles e colaboradores (2020), foram *C. leopoldoi* (61,5%), seguido por *C. limai* (16,4%) e *C. insignis* (12,8%), enquanto em nossos estudos as espécies mais abundantes foram *C. insignis*, *C. limai* e *C. guttatus* (83,83%, 11,59% e 3,00%, respectivamente).

Espécies de importância médica e veterinária foram encontradas em nosso estudo. *Culicoides insignis* e *C. pusillus* são considerados os principais vetores do BTV nas Américas Central e do Sul (MO et al., 1994; MELLOR; BOORMAN; BAYLIS et al., 2000), *C. debilipalpis* também pode estar envolvido na vetoração de BTV. Enquanto *C. paraensis* está envolvido na transmissão do vírus Oropouche. O papel dessas espécies deve ser considerado em futuros programas de vigilância em saúde única tanto por sua capacidade vetorial quanto pelo aborrecimento dos seres humanos (RONDEROS; GRECO; SPINELLI, 2003) e animais.

Culicoides insignis é uma espécie generalizada frequentemente associada a animais e comumente encontrada em ambientes de pastagem com bovinos e suínos (KRAMER; GREINER; GIBS, 1985; GREINER et al., 1993; COSTA et al., 2013; CARVALHO; SILVA, 2014; BANDEIRA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017). Já foram registrados nos seguintes Estados do Brasil: Amazonas, Pará, Rondônia, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021).

C. pusillus tem sido registrado no Brasil nos seguintes Estados: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. Enquanto *C. debilipalpis*, no Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021).

Culicoides limai é uma espécie florestal com uma ampla gama de hospedeiros (DE BARROS; MARINHO; REBÊLO, 2007; SILVA; CARVALHO, 2013), sendo

identificado no Brasil nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021).

C. foxi foi frequentemente coletada atacando o homem no período noturno (CASTELLÓN, 1990), sendo descrito nos Estados: Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021). *Culicoides leopoldoi*, é uma espécie amplamente distribuída que está associada à avicultura e uma ampla gama de mamíferos no Brasil (De BARROS; MARINHO; REBÊLO, 2007; COSTA et al., 2013; CARVALHO; SILVA, 2014). É amplamente difundido na América Central e do Sul e parece não ter importância epidemiológica na transmissão de doenças ao homem e outros animais (FELIPPE-BAUER et al., 2019). No Brasil já foi encontrado em Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021).

C. venezuelensis foi identidade nos Estados do Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021). Enquanto *C. brasilianum* nos Estados do Amazonas, Pará, Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021).

As espécies *C. pifanoi*, *C. glabellus* e *C. diffusus* tem sua primeira identificação no Estado de São Paulo. Sendo *C. pifanoi* já descrito em Pará, Bahia, Ceará e Rio de Janeiro, *C. glabellus* foi descrito em Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Bahia, enquanto *C. diffusus*, foi descrito apenas no Estado do Espírito Santo (SANTARÉM; FELIPPE-BAUER, 2021).

De acordo com Wilson; Mellor (2009), o ambiente pode influenciar na proliferação de *Culicoides*, solos úmidos, esterco, madeira, cascas de árvores, proporcionam um ambiente adequado para a proliferação destes vetores. Fato este também observado nas propriedades analisadas.

Nas capturas realizadas em nosso estudo não identificamos mosquitos do gênero *Aedes*. Esse dado pode ser justificado pelo fato do seu comportamento ser marcadamente

antropofílico e endofílico (DZUL-MANZANILLA et al., 2017) sendo que as armadilhas foram colocadas em ambiente rural. O *Ae. aegypti* está bem adaptado para completar todo o seu ciclo de vida em áreas urbanas dentro e ao redor das casas, principalmente se alimentando de humanos em uma frequência muito alta (KUNO 1995; De BENEDICTIS et al., 2003; STODDARD et al. 2013; LIEBMAN et al. 2014). Além disso, o método de coleta pode interferir nas espécies capturados, pois de acordo com Costa e colaboradores (2013) nos inventários entomológicos, é comum que algumas espécies apareçam com baixa frequência porque o tipo de armadilha, bem como o ambiente de coleta e a presença de animais podem favorecer a captura de outras espécies.

Nenhum dos mosquitos amostrados para detecção de ZIKV e BTV foram positivos. Nossos resultados corroboram com os resultados encontrado por Rondero; Greco; Spinelli (2003) que não identificaram BTV nos *Culicoides* capturados, sendo *C. insignis*, a espécie mais abundante encontrada. No Brasil, apesar da fauna de *Culicoides* ser pouco estudada, em pesquisas realizadas nos Estados do Acre, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Maranhão, e Amapá, *C. insignis* foi identificado como a espécie mais abundante nestas regiões. Apesar da presença do vírus não ter sido detectada no vetor, estas regiões possuem comprovada evidência sorológica da presença do BTV (SILVA et al., 2001; LAENDER, 2002; BARROS et al., 2007; FELIPPE-BAUER et al., 2008).

É pertinente reforçar a grande diversidade de artrópodes vetores e vertebrados potenciais hospedeiros no Brasil (DIAS, 2019). Uma parcela significativa, no entanto, seja de invertebrados ou vertebrados, ainda permanece desconhecida e intocada no interior das matas virgens, aumentando a complexidade da ecoepidemiologia das arboviroses no Brasil (GUEDES, 2012). Dessa forma, Dias (2019), reforça a importância de que estudos de investigação ativa, como descrito no presente trabalho, visando a detecção precoce da circulação silenciosa de arbovírus patogênicos, antecedendo a ocorrência de epizootias e casos humanos, contribuem para a vigilância do país e devem ser incentivados.

7 CONCLUSÃO

- O RNA do ZIKV foi identificado em cervídeos, no entanto, esses achados não definem a real participação de cervídeo no ciclo de transmissão do vírus ZIKV, bem como dos outros ruminantes domésticos analisados. Sendo necessário mais estudos de campo e experimentais para análise da competência do hospedeiro e vetorial, bem como a dinâmica da interação vírus-hospedeiro e vírus-vetor, pesquisas sorológicas e vigilância ativa.
- Os valores de Ct tardios detectados na RT-qPCR evidenciaram um fator limitante para o sequenciamento de ZIKV.
- O RNA de BTV foi detectado nas espécies bovinas e ovinas evidenciando a circulação viral nas regiões estudadas assim como o RNA de BVDV em amostras de bovinos.
- Os testes moleculares utilizados na pesquisa mostraram sensibilidade e especificidade, onde não foi detectado reações cruzadas entre ZIKV, BVDV e BTV nos testes realizados.
- Não identificamos o ZIKV e o BTV nos dípteros analisados pela técnica de RT-qPCR.
- Identificamos 14 espécies de *Culicoides*, sendo que esse trabalho contribui para a ampliação da distribuição geográfica das espécies *C. pifanoi*, *C. glabellus* e *C. diffusus*, agora com registro no Estado de São Paulo;
- No presente projeto não foi identificado a presença de espécies do gênero *Aedes*;
- Este trabalho foi pioneiro no estudo das arboviroses em animais, na qual associou pesquisa em animais e insetos nas regiões estudadas e que podem contribuir para uma vigilância integrada (epidemiológica e entomológica).
- O presente estudo ilustra a importância de pesquisas integradas e multidisciplinares para a promoção de saúde dos animais domésticos, animais silvestres, população humana e meio ambiente. Os animais domésticos e silvestres testados, apesar de não apresentarem sintomatologia clínica compatível com as patologias estudadas, evidenciaram a circulação de ZIKV, BTV e BVDV, nas espécies de bovinos, ovinos, caprinos, e cervídeos, e por isso, mais investigações de vigilância ativa devem ser realizadas.

8 REFERÊNCIAS

ACHEE, N. L. et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. **PloS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 5, 2015. e0003655.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>

ALLAN, B. F.; KEESING, F.; OSTFELD, R. S. Effect of Forest Fragmentation on Lyme Disease Risk. **Conservation Biology**, n. 17, v. 1, p. 267–272, 2003.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01260.x>

ALLEN, T. et al. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. **Nature Communications**, v. 8, n. 1124, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00923-8>

ALTHOUSE, B. M. et al. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. **PLoS neglected tropical diseases.**,v. 10, n.12, 2016.:e0005055.

ALVES, F. A. L. et al. Seroprevalence and risk factors for Bluetongue in rams of the Sertão and Borborema mesoregions, semi-arid of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Ciência Rural** v. 39, p. 484-489, 2009.

AMBAGALA, A. et al. Susceptibility of Chicken Embryos, Sheep, Cattle, Pigs, and Chickens to Zika Virus Infection. **Front Vet Sci.** v. 7, n. 23, p. 1-8, 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.00023

ARADAIB, I. E. et al. Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 145-150, 2005.

ARENHART, S. et al., Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736-742, 2009.

ARMSTRONG, N.; HOU, W.; TANG, Q. Biological and historical overview of Zika virus. **World J Virol.**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2017. doi:10.5501/wjv.v6.i1.1

ATIF, M. et al. Zika virus disease: a current review of the literature. **Infection**. v. 44; p. 695–705, 2016.

AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet**, New York, p. 278-279, 16 Mar. 2016.

AZIZ, H. et al. Zika virus: global health challenge, threat and current situation. **J Med Virol**. v. 89, p.943–51, 2017.

BAJER, E. **Brock team finds first *Aedes aegypti* mosquitoes in Canada**. 2016
Disponível em: <<https://brocku.ca/brock-news/2016/10/brock-team-finds-first-aedesaegypti-mosquitoes-in-canada/>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

BAKER J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet. Clin. North Am.**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BALARO, M.F.A. Língua azul: desmistificando a doença. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.** v. 15, Supl. 2, p. 21-31, 2017.

BANDEIRA, M. C. A. et al. Infestation of Brazilian peridomestic areas by *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in humid and semihumid climates. **J Med Entomol**. v. 53, p. 1163–8, 2016.

BARR, K. L.; ANDERSON, B. D.; LONG, M.T. Working with Zika and Usutu Viruses in Vitro. **PLoS Negl Trop Dis**. Aug, v. 19, n. 10, p. 8, 2016.

BARROS, V. L. L. et al. Ocorrência de espécies de *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 11, p. 2789-2790, 2007.

BARZON, L. et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 10, 2016.

BASARAB, M. et al. Zika vírus. **BMJ** 352: i1049, 2016. doi:
<https://doi.org/10.1136/bmj.i1049>

BASQUEIRA, N. S. et al. An Assessment of Secondary Clinical Disease, Milk Production and Quality, and the Impact on Reproduction in Holstein Heifers and Cows from a Single Large Commercial Herd Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2. **Viruses**, v. 12, n. 760, 2020. doi:10.3390/v12070760

BASQUEIRA, N. S. et al. Bovine Respiratory Disease (BRD) Complex as a Signal for Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Presence in the Herd. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1434, 2017.

BATTEN, C. A. et al. Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics, pathogenesis and possible contact transmission in goats. **Vet Microbiol.**, v. 157, n. 1–2, p. 119–124, 2013.

BAUERMAN, F.V. et al. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 25, n. 1, p. 6-15, 2013.

BEARCROFT, W. G. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 50, n. 5, p. 442-448, 1956.

BEATY, B. J.; CALISHER, C. H.; SHOPE, R. E. Arboviruses. In: SCHMIDT, N. J.; EMMONS, R. W. (Ed.). **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. Washington: American Public Health Association, 1989. p.797-855.

BENGIS, R. G.; KOCK, R. A.; FISCHER, J. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. **Rev Sci Tech**. v. 21, n. 1, p. 53-65, 2002. doi: 10.20506/rst.21.1.1322. PMID: 11974630.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**. v. 19, n. 13, 2014.

BHANUPRAKASH V. et al. Bluetongue vaccines: the past, present and future. **Expert Reviews Vaccines**, Abingdon, v. 8, p. 191– 204, 2009.

BORKENT, A; DOMINIAK, P. **Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae)**. Zootaxa. v. 5, n. 4787, 2020. 4787.1.1. doi: 10.11646/zootaxa.4787.1.1. PMID: 33056456.

BORKENT, A. **The Biting Midges, the Ceratopogonidae**. In: Marquardt, W.C. (Eds). *Biology of Disease Vectors*. 2ª Ed. Elsevier Academic Press. Burlington, San Diego, London. p. 113-126, 2005.

BOTTON, S.A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 31, n. 11, p.1429-1438, 1998.

BRAKS, M. A. et al. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. **J Med Entomol.**, v. 40, n. 6, p. 785-94, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Febre de chikungunya: manejo clínico /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 37, 2016**. Boletim epidemiológico 47 (34) Available:<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/10/2016-026-2-.pdf>. (acesso em outubro de2017).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 42, 2018**. Boletim Epidemiológico. <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. (acesso em novembro 2020).

BRICKLE, D.S.; HAGAN, D.V. The Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) of Belize, Central America. **Insecta Mundi** v. 13, n. 1-2, p. 39-44, 1999.

BRITO, W. M. E. D. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no esta do de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 7-18. jan.-mar. 2010.

BROCK, K. V.; GROOMS, D. L.; GIVENS, M. D. **Reproductive Disease and Persistent Infections**. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p.145-156, 2005.

BROWN, J. E. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**: v. 68, p. 514-525, 2013.

BROWN, J. E. et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proc Biol Sci**: v. 278, p. 2446-2454, 2011.

BROWNLIE, J.; CLARK, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Research Veterinary Science**, London, v.46, n.3, p.307-311, 1989.

BUECHLER, C. R. et al. Seroprevalence of Zika Virus in Wild African Green Monkeys and Baboons. **mSphere.**, v. 2, n. 2, 2017. :e00392-16. Published 2017 Mar 8. doi:10.1128/mSphere.00392-16

BUENO, M. G. et al. Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 12, p. 1-13, 2016.

BUMBAROV, V. et al. 2020. Characterization of bluetongue virus serotype 28. **Transbound Emerg Dis.**, n. 67, v. 1, p. 171–182, 2020.

CAMPBELL, J. R. **Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot**. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 39-50, 2004.

CANÁRIO, R. et al. **Diarréia Viral Bovina: Uma afecção multifacetada**. *Veterinaria.com.pt*, v. 1, n. 2, 2009.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**. v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CARVALHO, L. P. C. et al. A study of *Culicoides* in Rondônia, in the Brazilian Amazon: species composition, relative abundance and potential vectors. **Med Vet Entomol**. v. 31, p. 117–22, 2017.

CARVALHO, L. P. C.; SIL CORNISH VA, F. S. Seasonal abundance of livestock-associated *Culicoides* species in northeastern Brazil. **Med Vet Entomol**. v. 28, p. 228–31, 2014.

CASEY-BRYARS, M. et al. Risk factors for detection of bovine viral diarrhoea virus in low-risk herds during the latter stages of Ireland's eradication programme. **Prev Vet Med**, v. 201, n. 105607, 2022. doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105607. Epub 2022 Mar 2. PMID: 35305395.

CASTELLÓN, E. G. *Culicoides* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) na amazônia brasileira. II. Espécies coletadas na reserva florestal ducke, aspectos ecológicos e distribuição geográfica. **Acta Amaz**. v. 20, p. 83 – 93, 1990.

CASTELLÓN, E. G.; FELIPPE-BAUER, M. L. 2015. **Classificação e distribuição das espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) na Amazônia Brasileira ou Amazônia Legal**. In: Castellón, E.G.; Veras, R.S. (Eds). *Maruins (Culicoides: Ceratopogonidae) na Amazônia brasileira*. Editora INPA, Manaus, Amazonas. p. 29-73, 2015.

CASTELLÓN, E. G.; VERAS; R. S. **Maruins (Culicoides: Ceratopogonidae) na Amazônia brasileira** / Editores Eloy Guillermo Castellón, Rosana de Souza Veras. -- Manaus: Editora INPA, 144p.,2015.

CASTRO, R. S. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Tropic. Anim. Health Prod.** v. 24, p. 173-176, 1992.

CATENACCI, L. S. **Abordagem “one health” para vigilância de arbovírus na Mata Atlântica do sul da Bahia, Brasil.** Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Virologia do Instituto Evandro Chagas, para obtenção do título de Doutor em Virologia, 309f., 2017.

CATENACCI, L. S.; ALCÂNTARA, B. N. **Zika Virus: a Real Threat for Wildlife?** In: MILLER, E; LAMBERSKI, N.; CALLE, P. (Ed.). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*. 9th Ed. New York: Elsevier Press. Chapter 51, (June 2018)

CDB. Convention on Biological Diversity (2017). **Guidance on integrating biodiversity consideration into One Health approaches.** CBD/SBSTTA/21/9. <https://www.cbd.int/doc/c/8e34/8c61/a535d23833e68906c8c7551a/sbstta-21-09-en.pdf>

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2016). **Zika Virus: Transmission & Risks.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/zika/transmission/>. Acesso em: 16 de maio de 2017.

CFMV. **Saúde Única.** <http://portal.cfmv.gov.br/site/pagina/index/artigo/86/secao/8>. Acesso em 15/10/2019.

CFSPH, 2015. **The Center for Food Security & Public Health.** Bluetongue. 2015. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bluetongue.pdf>. Acesso em junho 2017.

CHAN, K.H. et al. The Effects of Temperature and Relative Humidity on the Viability of the SARS Coronavirus. **Advances in Virology**, 2011, 734690. <https://doi.org/10.1155/2011/734690>

CHANNAPPANAVAR, R. et al. Enhanced proinflammatory cytokine activity during experimental bluetongue virus-1 infection in Indian native sheep. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 145, n. 1–2, p. 485–492, 2012.

CHARRE, C. et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. **Virus Evol.** v. 6, n.2, 2020 doi: 10.1093/ve/veaa075. PMID: 33318859; PMCID: PMC7665770.

CHAVES, N. P. et al. Frequencia e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina em bovinos leiteiro não vacinados no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 495-502, 2012.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis** v. 10, n. 3, 2016.

CHRISTOPHERS, S. R. ***Aedes aegypti* (L.): the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure.** London: Cambridge University Press; 750p, 1960.

Disponível em:

http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers_1960.pdf

CHUA, L. et al. Evidence of Zika Virus Infection in Wild Long-Tailed Macaques, Peninsular Malaysia. **Emerging Infectious Diseases.** v. 25, n. 2, p. 374 – 376, 2019.

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. **Veterinary Record** v.7. p.301-302, 2002.

CLEAVELAND, S.; LAURENSEN, M. K.; TAYLOR, L. H. Diseases of humans and their domestic mammals: Pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 256, n. 1411, p. 991-999, 2001. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0889>

- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes, volume 3, transmission of viruses and interactions with bacteria.** CABI, Cambridge, 2012; 584 pp.
- CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol.**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012. Doi: 10.1016/j.jcv.2012.07.004
- COETZEE, P. et al. Transplacental infection in goats experimentally infected with a European strain of bluetongue virus serotype 8. **Vet J.** v. 197, n. 2, p. 335-41, 2013.
- COETZEE, P. et al. A review of experimental infections with bluetongue virus in the mammalian host. **Virus Res.**, n. 182, p. 21–34, 2014.
- COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol.**, v. 8, n. 2, p. 155-76, 2013.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-de-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Fiocruz, Reimpressão. 225p, 1998.
- CORNISH, T.E. et al. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 110–117, 2005.
- CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 4, p.211216, 2006.
- COSTA, J. C. et al. Espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) e hospedeiros potenciais em área de ecoturismo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 3, p. 11-18, 2013.

COSTA, J. R. R. et al. Bluetongue virus antibodies in cattle and sheep in Southwest and Southeast regions of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 58, n. 2, p. 273-275, 2006.

CROVELLO, T.J. & HACKER, C.S. Evolutionary strategies in life table characteristics among feral and urban strains of *Aedes aegypti* (L.). **Evolution. Jun**, v.26, n.2, p.185-96, 1972.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature.** v. 534, p. 267–71, 2016. doi: 10.1038/nature18296

CURRIER, R. W.; STEELE, J. H. One health-one medicine: unifying human and animal medicine within an evolutionary paradigm. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1230, n. 1, p. 4-11, 2011. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06138.x

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". **Distribuição dos Casos Notificados e Confirmados de Febre pelo Vírus Zika, por mês de início de sintomas e semana epidemiológica, Estado de São Paulo, 2019.** Disponível em: https://saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/zika/zika18_se.htm?attach=true. Acessado em 23 de março de 2022.

DANIELS, P. Arboviruses of veterinary significance in the Asia-western pacific region, such as japanese encephalitis virus. **Conf. OMSA** p. 167-180, 2001.

DARBELLAY, J. et al. Neonatal pigs are susceptible to experimental Zika virus infection. **Emerg Microbes Infect.** (2017A) 6:e6. 10.1038/emi.2016.133

DARBELLAY, J. et al. Zika virus causes persistent infection in porcine conceptuses and may impair health in offspring. **EBioMedicine.** v. 25; p. 73–86, 2017b. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.021

DARWISH, M. A. et al. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 77, n. 4, p. 442-445, 1983.

DASZAK, P. et al. Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 1026, p. 1-11, 2004.

DE BARROS, V. L. L.; MARINHO, R. M.; REBÊLO, J. M. M. Ocorrência de espécies de *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cad Saude Publica**. V. 23, p. 2789–90, 2007.

De Benedictis, J., E. Chow-Shaffer, A. Costero, G. G. Clark, J. D. Edman, and T. W. Scott. 2003. Identification of the people from whom engorged *Aedes aegypti* took blood meals in Florida, Puerto Rico, using polymerase chain reaction-based DNA profiling. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 68: 437–446.

De MELLO MALTA, F. et al. Mass molecular testing for COVID19 using NGS-based technology and a highly scalable workflow. **Sci Rep.**, v. 11, n. 1, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-86498-3. PMID: 33782491; PMCID: PMC8007582.

DEREGT, D. **Introduction and history**. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Ed.). Bovine viral diarrhea virus. Iowa: Blackwell Publishing, cap. 1, p.3-33, 2005.

DESMECHT, D. et al. Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. **Vet Rec**. V. 163, n. 2, p. 50-2, 2008.

DEZEN, S. et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesq. Vet. Bras.** vol.33 no.2 Rio de Janeiro Feb. 2013

DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS One.**, Oct v. 13, n. 9, p. 10, 2014. :e109442. doi: 10.1371/journal.pone.0109442. eCollection 2014.

DIAS, H. G. **Investigação do vírus zika e outros flavivírus em animais silvestres no centro-oeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical Rio de Janeiro, 163 f., 2019.

DICK, G. W. A. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, Sep, v. 46, n. 5, p. 521-34, 1952. doi: 10.1016/0035-9203(52)90043-6.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.46, n.5, p.509-520, 1952.

D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N Engl J Med** v. 374. n. 22, p. 2195-2198, 2016.

DREW, C. P. et al. Bluetongue virus infection activates bovine monocyte-derived macrophages and pulmonary artery endothelial cells. **Vet Immunol Immunopathol.**, n. 136; v. 3–4; p. 292–296, 2010.

DROLET, B. S. et al. Experimental infection of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with northern European bluetongue virus serotype 8. **Vet Microbiol** v. 166; p. 347–355, 2013.

Du TOIT, R.M.; Du TOIT, P.J. The transmission of blue-tongue and horse-sickness by *Culicoides*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 19, n.1-2, 1944

DUARTE JMB, REIS MLR. [eds.]. **Plano de Ação Nacional Para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção**. ICMBIO, Brasília, 128 pp., 2012.

DUDLEY, D.M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nat. Commun.**, v. 7, n. 12204, 2016. DOI:10.1038.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med.**, Jun, v. 360, n. 24, p. 2536-43, 2009. doi: 10.1056/NEJMoa0805715.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Infectious Zika viral particles in breast milk. **Lancet** v. 387, n. 10023, p. 1051, 2016.

DZUL-MANZANILLA, F. et al. Indoor resting behavior of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Acapulco, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 2, p. 501-504, 2017.

FAGBAMI AH. Zika virus infections in Nigeria: Virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J Hyg (Lond)** n. 83, p. 213–219, 2009.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **GLOBAL FOREST RESOURCES ASSESSMENT 2015 How are the world's forests changing?** 2016.

FARIA, N. R.; et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**. v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016. doi: 10.1126/science.aaf5036.

FARIAS, E. S. et al. *Culicoides hildebrandoi*, a new species of the reticulatus species group from the Brazilian Amazon Region (Diptera, Ceratopogonidae). **Zookeys**, v. 571, p. 105-111, 2016.

FARIAS, E. S. et al. Diversity of potential disease vectors *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) potential vectors of disease, in different environments in an Amazonian rural settlement, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 53, 2020. doi: 10.1590/0037-8682-0067-2020.

FARIAS, E. S. et al. Hematophagous biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. **Checklist**, v. 11, n. 4, p. 1-5, 2015.

FAVORETTO, S. et al. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. **bioRxiv**, 2016. 049395; DOI: <https://doi.org/10.1101/049395>

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika vírus during Its Emergence in the 20th Century. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2014.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virol J.**, v. 22, n. 10, p. 311, 2013. doi: 10.1186/1743-422X-10-311. PMID: 24148652; PMCID: PMC4016539.

FELIPPE-BAUER et al. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Ceará State, northeastern Brazil: Diversity, new records and bionomic approaches. **Cuadernos de Investigación UNED**, Sabanilla, Montes de Oca, v. 11, n. 2, p. 137-144, June 2019. Available from <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-42662019000200137&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 de março de 2022. <http://dx.doi.org/10.22458/urj.v11i2.2149>.

FELIPPE-BAUER, M. L. A importância do padrão das manchas das asas em *Culicoides* (Latreille, 1809) (Diptera: Ceratopogonidae): sua limitação. **Entomol Vect.** V. 10, n. 4, p. 595-600, 2003.

FELIPPE-BAUER, M. L. et al. New records of *Culicoides* latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. **Biota Neotropica, Campinas**, v. 8, n. 2, p. 33-38, 2008

FELIPPE-BAUER, M.L.; CÁCERES, A.G.; SILVA, C.S.; VALDERRAMABAZAN, W. & GONZÁLES-PEREZ, A. Two new *Culicoides* of the paraensis group (Diptera: Ceratopogonidae) from the Amazon Region of Peru. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 98, n. 8), p.1051-1058, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and infection.**, v. 2, n. 13, p. 1643-9, 2000.

FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

FINO, T. C. M. et al. Diarreia bovina a vírus (BVD) - uma breve revisão. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 34, n. 2, p. 131-140, abr/jun 2012.

FIOCRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Aedes aegypti*, introdução aos aspectos científicos do vetor. Instituto Oswaldo Cruz, 2019. Disponível em: <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=68>. Acesso em: 14 maio. 2019.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil Viral – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FONSECA, D. S. R.; BRAZ, C. K. R. Investigação epidemiológica da distribuição geográfica do *Aedes aegypti* na cidade de Montes Claros (MG) com uso de geotecnologias. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 62, n. 03, p. 489-503, 2010.

FORATTINI, O. P.; RABELLO, E.; PATTOLI, D. **Culicoides da região Neotropical (Diptera, Ceratopogonidae)**. II - Observações sobre biologia em condições naturais. Arquivos Da Faculdade De Higiene E Saúde Pública Da Universidade De São Paulo, v. 12, n. 1, p. 1-52, 1958. <https://doi.org/10.11606/issn.2358-792X.v12i1p1-52>

FORATTINI, O.; RABELLO, E. X.; PATTOLI, D. A brief note on breeding places of *Culicoides* in São Vicente, Brazil. **Mosquito News**, v. 17, n. 4, p. 312-313, 1957.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. São Paulo: EDUSP; 864 p, 2002.

FORATTINI, O.P. *Culicoides* da Região Neotropical (Diptera, Ceratopogonidae). **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo** v. 11, p. 159–526, 1957. doi: 10.11606/issn.2358-792X.v11i2p161-526

FORATTINI, O.P. Entomologia Médica. **Faculdade de Higiene e Saúde Pública**. São Paulo, v.1, 662p., 1962.

FRAGOSO-MOURA, E. N. et al. Loss of biodiversity in a conservation unit of the Brazilian Atlantic Forest: the effect of introducing non-native fish species. **Braz J Biol.** Feb; v. 76, n. 1, p. 18–27, 2016.

FRANDOLOSO, R. et al. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região Nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1102-1106, out./dez. 2008.

FRANZ, A. W. et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 103, n. 11, p. 4198-203, 2006.

FREIRE, B. et al. Seroprevalence of zika virus in a cattle flock. **Arq. Inst. Biol**; 88: e00802019, 2021. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000802019>

GAETA, N. C. et al. Detecção de anticorpos anti-pestivírus em ovinos com histórico de problema reprodutivo no Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 38, n. 2, p. 153-156, abr/jun 2016.

GAROUSI, M. T. The Effects of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus with Sperm Cells on In Vitro Fertilization of Bovine Oocytes. **Vet. Res. Comm.**, v. 31, p. 365- 370, 2007.

GETHMANN, J.; PROBST, C.; CONRATHS, F. J. Economic impact of a bluetongue serotype 8 epidemic in Germany. **Front Vet Sci.**, v. 7, n. 65, 2020.

GIAMMARIOLI, M. et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. **Virus Genes**. 2014. Doi: 10.1007/s11262-014-1132-2

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

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. Immunology of chronic BVDV infections. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 26-30, 2015.

GOFFREDO, M.; MEISWINKEL, R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. **Veterinária Italiana**, v. 40, n. 3, p. 260-265, 2004.

GONDIM, A. C. L. O. **Diarreia Viral Bovina**. Monografia. (Curso de Pós-Graduação “Latu Sensu” em Produção e Reprodução de Bovinos) - Universidade Castelo Branco. Brasília, Brasil, 2006.

GONZÁLES GONZÁLES DE HEREDIA, M.; GOLDARAZENA LAFUENTE, A. **El género *Culicoides* en el país Vasco**. Guía práctica para su identificación. Departamento de Medio Ambiente, Planificación territorial, Agricultura y Pesca, Eusko Jaurlaritza, Gobierno Vasco. 247 pp, 2011.

GONZÁLEZ, M. A. et al. Significant reduction in abundance of peridomestic mosquitoes (Culicidae) and *Culicoides* midges (Ceratopogonidae) after chemical intervention in western São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 549, 2020.

GORCH, C. et al. Lengua Azul: Aislamiento y caracterización del virus e identificación de vectores en el noreste argentino. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 34, p. 150-156, 2002.

GORCH, C.; LARGER, I. Lengua azul. Actualización sobre el agente y la enfermedad. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 33, p. 122-132, 2001.

GOURINAT, A. et al. Detection of Zika virus in urine. **Emerg. Infect. Dis.** v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GRAIG, M. et al. Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhoea viruses (BDVD) in serologically negative animals. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 148-151, 2015.

GRARD, G. et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? **PLoS Negl Trop Dis.** v. 4; v. 8, n. 2, 2014.

GREINER, E. C. et al. Epidemiology of bluetongue in Central America and the Caribbean: initial entomological findings. Regional bluetongue team. **Med Vet Entomol.**, v. 7, p. 309–15, 1993.

GREWAR, J. D. The economic impact of bluetongue and other orbiviruses in sub-Saharan Africa, with special reference to Southern Africa. **Vet Ital.**, n. 52, v. 3–4; p. 375–381, 2016.

- GROOMS D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.
- GROOMS, D.; BAKER, J. C.; AMES, T. R. **Doenças causadas pelo vírus da diarréia viral bovina**. In: Smith BP. Medicina Interna de Grandes Animais. 3ª ed. São Paulo, Brasil: Manole, p.707-714, 2006.
- GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 951, n. 1, p. 13-24, 2001. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x
- GUEDES, M. P. Culicidae (Diptera) no Brasil: relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 283-96, 2012.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis.**, 2012; 6:e1477.
- HASSELL, J. M. et al. Urbanization and disease emergence: Dynamics at the wildlife–livestock–human interface. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 55–67, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>
- HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. **Emerg Inf Dis**, v. 15, p. 1347–1350, 2009.
- HENDERSON, B. E.; HEWITT, L. E.; LULE, M. Serology of wild mammals. In: Virus Research Institute, **Annual Report**. East African Printer, Nairobi, Kenya, p.48-51, 1968.
- HENNESSEY, M; FISCHER, M; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR.**, v. 16, n. 3, 2016. <https://doi.org/10.1111/ajt.13743>
- HEYMANN, D. L.; DIXON, M. Infections at the animal/human interface: shifting the paradigm from emergency response to prevention at source. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 366, p. 207-15, 2013. doi: 10.1007/82_2012_285. PMID: 23239233; PMCID: PMC7121159.

HOAR, B. R. et al. Regional risk of exporting cattle seropositive for bluetongue virus from the United States. **Am J Vet Res.**, n. 64, n. 5, p. 520–529, 2003.

HOFFMANN, A. A. et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature.**, v. 476, p. 454–7, 2011.
doi:10.1038/nature1035.

HOLSBACK, L. et al. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 22, n. 2, p. 302-306, 2013.

HOOFT van IDDEKINGE, B. J. L.; van WAMEL, J. L. B.; van GENNIP, H. G. P.; MOORMANN, R. J. M. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, n. 30, p. 21-34, 1992.

HORNER, G. W. et al. Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. **Vet Microbiol.**, v. 43, p. 75–84, 1995. doi: 10.1016/0378-1135(94)00080-G.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137-143, 2003.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary microbiology**, v. 64, p. 89-107, 1999.

HOUE, H.; PEDERSEN, K. M.; MEYLING, A. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.15, p.117- 123, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Prod. Pec. munic.**, Rio de Janeiro, v. 47, p.1-8, 2019.

ICTV **International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2019 Disponível em:

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rnaviruses/w/Flaviviridae/360/genus-flavivirus. Acesso em: 25 Nov 2020.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2017. Virology Division – IUMS. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 12 de maio de 2017.

Inspere – Centro de Agronegócio Global. Impactos da COVID-19 nos sistemas agroalimentares e o papel do Brasil. Parte II: Saúde Única, Zoonoses e Segurança do Alimento. Texto para discussão, n.3, 2020.

IUCN. International Union for the Conservation of Nature. 2021. **The IUCN red list of threatened species**, version 2021- 3. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed Oct 2021.

JACKOVA, A. et al. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. **Vet. Res. Commun.**, v. 32, p. 7-11, 2008.

JAVMA, 2008. Journal of the American Veterinary Medical Association. **One Health — a New Professional Imperative**. 76p., 2008.

JOHNSON, B. K. et al. Arbovirus isolations from mosquitoes: Kano Plain, Kenya. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 71, p. 512–517, 1977. pmid:605465

JOHNSON, C. K. et al. Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. *Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences***, v. 287, n. 1924, 2020. 20192736. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2736>

JOHNSON, P. T. J.; OSTFELD, R. S.; KEESING, F. Frontiers in research on biodiversity and disease. **Ecol. Lett.**, v. 18, n. 10, p. 1119-1133, 2015.

JONES, B. A. et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8399–8404, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06536>

KAPIL, S. et al. Immunity and immunosuppression. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus. **Iowa: Blackwell Publishing**, cap. 9, p. 157-170, 2005.

KARABATSOS N. **International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. 3rd ed. San Antonio - USA: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985.

KARESH, W. B. et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **Lancet.**, v. 380, p. 1936-1945, 2012.

KATZ, J. et al. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, p. 139-142, 1994.

KAWANAMI, A. E. et al. Detecção de vírus da língua azul em cervídeos brasileiros no estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. v. 38, n. 1, p. 137-142, 2018. ISSN 1678-5150.

KEESING, F.; HOLT, R. D.; OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecol. Lett.**, v. 9, n. 4, p. 485-498, 2006.

KELLY, A. M. et al. **Uma saúde, segurança alimentar e medicina veterinária**. Jornal da Associação Americana de Medicina Veterinária, 2013.

KETTLE, D. S. Biology and bionomics of bloodsucking Ceratopogonids. **Ann Rev Entomol.** Jan; v. 22 p. 33-51, 1977.

KETTLE, D. S. The bionomics and control of *Culicoides* and Leptoconops (Diptera, Ceratopogonidae = Heleidae). **Ann Rev Entomol.** V. 7, p. 401-18, 1962.

KIKUTI, M. et al. Spatial Distribution of Dengue in a Brazilian Urban Slum Setting: Role of Socioeconomic Gradient in Disease Risk. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 7, p. 1-18, 2015.

KIM, S. G; DUBOVI, E. J. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 103-6, 2003. doi: 10.1016/s1045-1056(03)00023-x. PMID: 12770539.

KIRKLAND, P.D.; MELVILLE, L.F.; HUNT, N.T.; WILLIAMS, C.F.; DAVIS, R.J. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. **Vet Ital.** v. 40, n. 4, p. 497-501, 2004.

KONRAD, P. A. et al. Antibodies against the blue tongue virus in dairy cattle in the state of Minas Gerais, Brazil and associations with reproductive problems. **Revta Fac. Zootec. Vet. Agron.**, Uruguaiana, v. 10, p. 42-51, 2003.

KRAMER, W. L.; GREINER, E. C.; GIBBS, E. P. Seasonal variations in population size, fecundity, and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. **J Med Entomol.**, v. 22, p. 163–9, 1985.

KRAMETTER-FROETSCHER, R. et al. Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. **Veterinary Journal**, v. 186, p. 342-346, 2010.

KUNO, G. et al. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? **Viruses**, v. 9, n. 7, 2017.

KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epidemiol. Rev.** v. 17, p. 321–335, 1995.

KUNO, G.; CHANG, G-JJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, p. 608–637, 2005.

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.** 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LAGE, A. P. et al. 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, p. 95-197, 1996.

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

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**. v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.

LANYON, S. R. et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 201-9, 2014.

LAROQUE, P. O. et al. Epidemiologic survey for arbovirus in galician capuchin monkeys (*Cebus avius*) free living in Paraíba and captive capuchin monkey (*Cebus libidinosus*) from northeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 462-8, 2014.

LARSKA, M.; KUTA, A.; POLAK, M. P. Evaluation of diagnostic methods to distinguish between calves persistently and transiently infected with bovine viral diarrhoea virus in respect to the presence of maternal antibodies. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 57, n. 3, p. 311-317, 2013. <https://dx.doi.org/10.2478/bvip-2013-0054>

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the western hemisphere. **J.Virol.**, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 2016.

LETA, S. et al. Modeling the global distribution of *Culicoides imicola*: an Ensemble approach. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

LEVACOV, D.; JERUSALINSKY, L.; FIALHO, M. S. **Levantamento dos Primatas recebidos em centros de triagem e sua relação com o tráfico de animais silvestres**. In: MELO, F. R.; MOURTHÉ, I (Org.). Primatologia do Brasil. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Primatologia, v. 11, p. 281-305, 2011.

LIEBLER-TENORIO, E. M. **Classification and molecular biology**. In: Goyal S.M & Ridpath J.F. (Eds), Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control. Blackwell Publishing, Iowa, p. 121-144, 2005.

LIEBMAN, K. A. et al. Determinants of heterogeneous blood feeding patterns by *Aedes aegypti* in Iquitos, Peru. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 8, 2014. : e2702.

LINDBERG, A. et al. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Rev sci tech Off int Epiz.**, v. 25, n. 3, p. 961-979, 2006.

LINDBERG, A. L. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 25, p. 1-16, 2003.

LINDBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 55-73, 2005.

LINLEY, J. R. Autogeny in the Ceratopogonidae: Literature and notes. Florida **Entomologist**, v. 66, n. 2, p. 228-234, 1983.

LONERAGAN, G. H. et al. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 226, n. 4, p. 595-601, 2005.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LUNARDI, M. et al. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Res. Vet. Sci.**, v. 85, p. 599-604, 2008.

LUZZAGO, C. S. et al. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. **Biomed Res. Int.** 2013. Doi: 10.1155/2014/147145

MAAN, S. et al. 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.

MAAN, S. et al. Full-genome sequencing as a basis for molecular epidemiology studies of bluetongue virus in India. **PLoS One**, 2015.

MAAN, S. et al. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.17, n.5, p.886-889, 2011.

MacLACHLAN, N. J.; OSBURN, B. I. Impact of bluetongue virus infection on the international movement and trade of ruminants. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 228 p. 1346-1349, 2006.

MacLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Flaviviridae*. In: MacLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. (Eds), Fenner's Veterinary Virology, 4th edn. p. 467 – 481. Academic Press, London, 2013.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 48, n. 2, p.139-45., 1954. doi: 10.1016/0035-9203(54)90006-1. PMID: 13157159.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 18, n. 3, p. 411-5, 1969. doi: 10.4269/ajtmh.1969.18.411. PMID: 4976739.

MATIAS, R. S. **Maruins não são borrachudos**. Disponível em: MARUINS NÃO SÃO BORRACHUDOS (chemone.com.br). Acesso em: 13 de agosto de 2019.

McCLURKIN, A. W.; LITTLEDIKE, E. T.; CUTLIP, R. C.; FRANK, G. H.; CORIA, M. F.; BOLIN, S. R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. **Canadian Journal Comparative Medicine**, Ottawa, v.48, p.156-161, 1984.

McCRAE, A. W.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 76, n. 4, p. 552-562, 1982.

MCDERMOTT, E. G; LYSYK, T. J. Sampling Considerations for Adult and Immature *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). **J Insect Sci.** Nov 1; v. 20, n., 2020 doi: 10.1093/jisesa/ieaa025. PMID: 33135756; PMCID: PMC7604845.

McGOWAN, M. R. et al. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. **Vet. Rec.**, v. 133, p.39 - 43, 1993.

McGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. **Nat Rev Microbiol.**, v. 11, n. 3, p. 181-93, 2013. doi: 10.1038/nrmicro2968.

MEDEIROS, D.B.A. **Caracterização molecular e relação filogenética do genoma completo dos arbovírus Bussuquara, Iguape, Ilhéus, e Rocio (família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*)**. 2009. 219p. Tese. (Doutorado em Biologia de agentes infecciosos e parasitários) – Universidade Federal do Pará. Belém do Pará, 2009.

MELLOR, P. S. Replication of arboviruses in insect vectors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, n. 4, 231-247, 2000. doi: 10.1053/jcpa.2000.0434

MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. **Ann Rev Entomol.**, v. 45, p. 307-40, 2000.

MELO, C. B. et al. Antibodies to bluetongue virus in bovines of Paraíba State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 52, n. 1, 2000.

MENZIES, F.D.; MCCULLOUGH, S.J.; MCKEOWN, I.M.; FORSTER, J.L.; JESS, S.; BATTEN, C. et al. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. **Vet Rec.**, v. 163, n. 7, p. 203-9, 2008.

MILLER, B. R.; BALLINGER, M. E. Aedes albopictus mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 82, n. 3, p. 476-7, 1988.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe.**, v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017. doi: 10.1016/j.chom.2017.01.004. PMID: 28182948; PMCID: PMC5328190.

MIRANDA, I.C.S., **Fatores associados a Infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina e pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 em rebanhos leiteiros da Mesorregião Centro-Oriental do Rio Grande do Sul.** 2012. 61. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – URS, Porto Alegre – RS.

MISHRA, S. et al. Entrapment of Saccharomyces cerevisiae and 3T3 fibroblast cells into blue light cured hydrogels. **J Biomed Mater Res A.**, v. 100, n. 10, p. 2829-38, 2012.

MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **N Engl J Med.** 2016 374:951–8. doi: 10.1056/NEJMoa1600651

MO, C. L. et al. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. **Am J Vet Res.**, v. 55, p. 211–5, 1994.

MONATH, T. P.; KEMP, G. E. Importance of non-human primate in yellow fever epidemiology in Nigeria. **Trop Geogr Med.**, v. 25, n. 1, p. 28-38, 1973.

MOREIRA-SOTO, A. et al. Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. **RESEARCH NOTE**, v. 24, n. 9, 2018. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.026> P1019.E1-1019.E4

MOTA, I. O. et al. Antibodies against bluetongue-virus group in goats and sheep from Pernambuco state and inferences on bluetongue epidemiology under tropical conditions. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 63:1595-1598, 2011.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **J. Clin. Virol.** v. 68, p. 53–55, 2015a.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. **Euro Surveill.**, v. 19, n. 14, pii.20761, 2014.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015b

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev.** v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016. doi: 10.1128/CMR.00072-15. PMID: 27029595; PMCID: PMC4861986.

NAPP, S.; ALLEPUZA, A.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ALBAA, A.; VILAR, M.J.; CASAL, J. Quantitative assessment of the probability of bluetongue virus transmission by bovine semen and effectiveness of preventive measures. **Theriogenology.** v. 75, n. 5, p. 920-32, 2011.

NEGRI FILHO, L. C. **Soroepidemiologia do Bluetongue Virus em ovinos e caprinos do Estado do Paraná.** 72 f. Dissertação de Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes (Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes) Universidade Norte do Paraná. Araçongas. 2017.

NEPSTAD, D. et al. Inhibition of Amazon deforestation and fire by parks and indigenous lands. **Conservation Biology**, vol. 20, n. 1, p. 110 65-73, 2006. doi: 10.1111/j.15231739.2006.00351.x

- NGUYEN, S. M. et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. **PLoS Pathog.** 2017. 13:e1006378. doi: 10.1371/journal.ppat.1006378
- NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Euro Surveill.** v. 21, n. 32, 2016.
- NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, P. L. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 27, Supl 3, p. 59–66, 1994.
- NOGUEIRA, A. H. C. et al. Detection of antibodies against the bluetongue virus in sheep in the region of Araçatuba, São paulo, Brazil. **Ciênc. Anim. Bras.** v. 10, p. 1271-1276, 2009.
- NOGUEIRA, A. H. C. et al. Prevalence of Bluetongue virus serotype 4 in cattle in the State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinaria Italiana**, v. 52, p. 319-323, 2016.
- NOGUEIRA, F.S., **Diagnóstico da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina em Propriedades da microrregião de Viçosa; Minas Gerais.** 41 f. Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 2003.
- NUNES, M. L. et al. Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **J Pediatr (Rio J).**, v. 92, n. 3, p. 230-240, 2016.
- OHC. **What is a One Health?**
https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/. 2019.
Acesso em 19/10/2019.
- OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature.**, v. 546, n. 7660, p. 646-50, 2017.

OLSON, J. G. et al. A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 77, n. 2, p. 131–137, 1983.

OLSON, J. G.; KSIAZEK, T. G. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 75, n. 3, p. 389-93, 1981. doi: 10.1016/0035-9203(81)90100-0. PMID: 6275577.

OMSA, 2018. World Organisation for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018**. Chapter 3.4.7 Bovine Viral Diarrhoea. 2018.

OMSA, 2019. **One World, One Health**. <https://www.omsa.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/one-world-one-health/>. 2019. Acesso em: 18/10/2019

OMSA, 2021. **World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Chapter 3.1.3. Bluetongue virus. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.03_BLUETO NGUE.pdf Acesso em: 16 de outubro de 2022.

OSUNA, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nat Med.** v. 22, p. 1448–55, 2016. 10.1038/nm.4206

PATZ, J. A.; HAHN, M. B. Climate change and human health: an One Health approach. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 366, p. 141-171, 2014.

PAUTASSO, A. et al. Mosquito Surveillance in Northwestern Italy to Monitor the Occurrence of Tropical Vector-Borne Diseases. **Transbound. Emerg. Dis.**, v. 60, n. 2, p. 154-161, 2013.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Zika Virus Surveillance at the Human–Animal Interface in West-Central Brazil, 2017–2018. **Viruses** n. 11, v. 1164, 2019; doi:10.3390/v11121164

PELLEGRIN, A. O. et al. Doenças da reprodução em bovinos no Pantanal: ocorrência de animais soropositivos para os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina e vírus da língua azul. **Empraba Pantanal**, Corumbá, v. 7, p. 1-7, 1977.

PERRUOLO, G. Keys of species of *Culicoides* (Diptera: ceratopogonidae) associated with cattle operations in neotropical region. **Rev. cient. (Maracaibo)** v. 19, n. 2, p. 124-133, 2009.

PERRY, B. D.; GRACE, D.; SONES, K. Livestock and global change special feature: Current drivers and future directions of global livestock disease dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 52, p. 20871-20877, 2011.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1012953108>

PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 107-111, 2003.

PETERSEN, L. R. et al. Zika virus. **N.Engl.J.Med.** v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.

PINIOR, B. et al. Economic comparison of the monitoring programmes for bluetongue vectors in Austria and Switzerland. **Vet Rec.**, v. 176, n. 18, p. 464, 2015.

POLLETO, R. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 595-598, mar-abr. 2004.

POSSEBOM, K. F.; MARTINS, L. R. V. **Soroprevalência da diarreia viral bovina na região noroeste do estado do rio grande do sul. Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica.** 2014.

POUR, S. Z. **Desenvolvimento e validação experimental de uma metodologia in-house para amplificação e sequenciamento do genoma completo do Zika vírus.** Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 111p. 2018

PRATA, A. Yellow fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 95 (Suppl. I), p. 183-187, 2000.

QUINCOZES, C. G. et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 269-276, abr./jun. 2007

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária**. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1737 p. 2002.

RADOSTITS, O. M.; LITTLE JOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. **Can Vet J. Jun**; v. 29, n. 6, p. 513-28, 1988. PMID: 17423063; PMCID: PMC1680792.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C. AND HINCHCLIFF, K.W. (2000) **Bovine mastitis**: In: Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9th Edition, W.B. Saunders Company Ltd., London.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine**. A textbook of the diseases of cattle, horse, sheep, pigs and goats. 10° ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. 2065 p.

RAGAN, I. K. et al. Investigating the Potential Role of North American Animals as Hosts for Zika Virus. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 3, p. 161-164, 2017. DOI: 10.1089/vbz.2016.2099

REAGAN, R. L. et al. Effect of Zika virus and Bwanba virus in the cave bat (*Myotis lucifugus*). **Trans Am Microsc Soc.**, v. 74, p. 77-79, 1955.

REUTER, J. D.; NELSON, S. L. Hematologic Parameters and Viral Status for Zika, Chikungunya, Bluetongue, and Epizootic Hemorrhagic Disease in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) on St. John, US Virgin Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 4, pp. 843–847, 2018.

RICHTER, V. et al. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Journal**, v. 220, n. June, p. 80-87, 2017.

RIDPATH, J. F. et al. Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhoea virus or a HoBi- like virus. **Am. J. Vet. Res.** v. 74, p. 438–442, 2013.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J.; FLORES, E.F. **Flaviviridae**. In: FLORES, E.F (org.). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, cap. 22, p. 564-591, 2007.

RIPDATH, J. F.; BAUERMANN, F. V.; FLORES, E. F. **Flaviviridae**. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária – Virologia Geral e Doenças Víricas*. Santa Maria: Editora UFSM, 2nd, p. 657-90, ed. 2012.

ROBERT, A. et al. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (western France). **Theriogenology**, v. 61, p. 117-127, 2004.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? **Rheumatology International.**, v. 35, n. 12, p. 2091-2094, 2015.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. et al. Orbiviruses in the Mediterranean basin: updated epidemiological situation of Bluetongue and new methods for the detection of BTV serotype 4. **Transbound Emerg Dis.**, v. 55, n. 5-6, p. 205-14, 2008. doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01029.x. PMID: 18666964.

ROHR, J. R. et al. Emerging human infectious diseases and the links to global food production. **Nature Sustainability**, v. 2, p. 445-456, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0293-3>

RONDEROS, M. M.; GRECO, N. M.; SPINELLI, G. R. Diversity of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the area of the Yacyretá Dam Lake between Argentina and Paraguay. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 98, p. 19–24, 2003.

ROVID, A. 2015. **Língua Azul**. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por Mendes, Ricardo. Serviço de Inspeção Sanitária e Fitossanitária de Animais e Plantas (USDA APHIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América. 2019. Disponível em <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheetspt.php?lang=pt>.

RUSSELL, P. K. The Zika Pandemic - A Perfect Storm? **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 3, 2016.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Semin Pediatr Neurol.** Sep; v. 19, n. 3, p. 130-51, 2012. Doi: 10.1016/j.spn.2012.03.002

RYAN, S. J. et al. Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 13, n. 3, 2019: e0007213.

SAEGERMAN, C. et al. The impact of naturally occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. **Vet J.** v. 187, n. 1, p. 72-80, 2011.

SAFARPOOR DEHKORDI, F. Prevalence study of Bovine viral diarrhea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. **AMB Expr** v. 1, n. 32, 2011. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-32>

SAIZ, J. et al. Zika virus: the latest Newcomer. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. 496, 2016.

SALUZZO, J. F, et al. Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 75, n. 3, p. 262–266, 1982.

SALVADOR, F. S.; FUJITA, D. M. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 World Cup: new possibilities. **Travel Medicine and Infectious Disease**. v. 14, n. 1, p. 49–51, 2016. doi: 10.1016/j.tmaid.2015.10.004.

SAMARA, S.I. et al, Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 396-403, 2004.

SAMINATHAN, M. et al. An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. **Vet Q**, v. 40, n. 1, p. 258-321, 2020. doi: 10.1080/01652176.2020.1831708.

SANTARÉM, M. C. A.; FELIPPE-BAUER, M. L. 2020. **Brazilian species of Biting Midges**. Coleção de Ceratopogonidae. FIOCRUZ, 69p., 2021.

SAVINI, G. et al. Epizootic haemorrhagic disease. **Res. Vet. Sci.**, v. 91, p. 1–17, 2011.

SAVINI, G. et al. Vaccines against bluetongue in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, n. 31, p. 101-120, 2008.

SBIZERA, M. C. R. et al. Detection of bluetongue virus antibodies in sheep from Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 41, n. 3, p. 879-886, maio/jun. 2020.

SBIZERA, M. C. R. **Ocorrência de anticorpos para o vírus da língua azul em ovinos no estado do Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado) UNOPAR - Medicina Veterinária - Saúde e Produção de Ruminantes, (Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes). Araçongas: UNOPAR, 2018. 75p, 2018.

SCOTT, T. W. et al. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologique technique. **Journal Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 94-9, 1993.

SHARMA, V. et al. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Can J Microbiol.**, Feb, v. 66, n. 2, p. 87-98, 2020. doi: 10.1139/cjm-2019-0331.

SHERLOCK, I. A. Dermatozoonosis by *Culicoides* bite (Diptera, Ceratopogonidae) in Salvador, state of Bahia, Brazil. IV-A clinical study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 63, n. 27-37, 1975.

SICK, F. et al. *Culicoides* Biting Midges—Underestimated Vectors for Arboviruses of Public Health and Veterinary Importance. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 376, 2019.

SILVA, B. F. S.; OLIVEIRA, M. L.; DUARTE, J. M. B. **Assessing the morphological identification of guard hairs from Brazilian deer**. Iheringia. Série Zoologia. 110p., 2020.

SILVA, C. S. et al. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I. Região Norte: Município de Campo dos Goytacazes. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 349-358, 2001.

SILVA, F. S.; CARVALHO, L. P. C. A population study of the *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in urban, rural, and forested sites in a Cerrado area of northeastern Brazil. **Ann Entomol Soc Am.**, v. 106, p. 463–70, 2013.

SILVA, T. G. et al. Prevalence and risk factors for bluetongue in the State of São Paulo, Brazil. **Vet Med Sci. Nov**; v. 4, n. 4, p. 280-287, 2018. doi: 10.1002/vms3.113

SILVA, T. G. **Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos, São Paulo, Brasil, 2011**. 2017. 121 f. 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.

SIMON-LORIERE, E. et al. Autochthonous Japanese encephalitis with yellow fever coinfection in Africa. **N. Engl. J. Med**, v. 376, p. 1483–85, 2017.

SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**, 5th Edition, Elsevier, St. Louis, Missouri, California, ISBN: 978-0-323-08839-8, pp. 318-319, 745-764, 2015.

- SOBREIRA, N. M. **Aspectos clínicos, hematológicos e imunológicos em fêmeas Holandesas persistentemente infectadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)**. – 2018, 129fl. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.
- SOLLBERG, I.; SCHIAVETTI, A.; MORAES, M. E. B. Agricultural management in the Una's Wildlife Refuge: a perspective of conservation by agroforestry. **Rev. Árvore**, v. 38, n. 2, p. 241-250, 2014.
- SOPER, F. L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**. Nov, v.14, n.6, p.887–91, 1965.
- SOUSA, V. E. et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em fêmeas bovinas leiteiras criadas em sistema de produção semi-intensivo. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.35, p.21-25, 2013.
- SOUZA, T. S. et al. Antibodies against the bluetongue virus in sheep flocks of Bahia state, Brazil. **Arqs Inst. Biológico**, São Paulo, v. 77, p. 419-427, 2010.
- SPERLOVA, A.; ZENDULKOVA, D. **Bluetongue: a review**. *Veterinari Medicina*, v. 56, n. 9, p. 430–452, 2011.
- SPETTER, M. J. et al. Frequência do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos bovinos argentinos e comparação de testes diagnósticos para detecção de BVDV em amostras de soro bovino: estudo preliminar. **Braz J Microbiol** (2020). <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00410-1>
- SPINELLI, G. R.; WIRTH, W.W. 1993. **Los Ceratopogonidae de la Argentina (Insecta: Diptera)**. In: Castellanos, Z. A. (ed). *Fauna de Agua Dulce de la Republica Argentina*. V. 38, n. 3, p. 1-121, 1993.

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

SPINELLI, G.R.; MARTINEZ, M.E. The genus *Culicoides* in Uruguay (Diptera: Ceratopogonidae). **Insecta Mundi** v.5, n. 3-4, p. 175-179, 1991.

SPINELLI, G.R.; RONDEROS, M.M.; DÍAZ, F.; MARINO, P.I. The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 100, n. 2, p. 137-150, 2005.

SPRECHER, D.J. et al. An outbreak of fetal and neonatal losses associated with the diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. **Theriogenology**, v. 36, p. 597-606, 1991.

STAPLES, J. E. et al. Interim guidelines for the evaluation and testing of infants with possible congenital Zika virus infection – United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 65, n. 3, p. 63-67, 2016.

STODDARD, S. T., B. M. et al. House-to-house human movement drives dengue virus transmission. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110: 994–999, 2013.

SUDIA, W. D.; CHAMBERLAIN, R. W. Battery-operated light trap, an improved model. By W. D. Sudia and R. W. Chamberlain, 1962. **J Am Mosq Control Assoc.** 1988 Dec;v. 4, n. 4, p. 536-8, 1988. PMID: 3066845.

SWADDLE, J. P.; CARLOS, S. E. Increased Avian Diversity Is Associated with Lower Incidence of Human West Nile Infection: Observation of the Dilution Effect. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. 1-8, 2008.

SWAMINATHAN, S. et al. Fatal Zika virus infection with secondary non sexual transmission. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, n. 19, p. 1907–1909, 2016.

TABACHNICK, W. J. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. **Vet Ital.**, v. 40, p. 45–50, 2004.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 356, n.1411, p. 983–989, 2001. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>

TERZIAN, A. C. B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 16034, p. 1-15, 2018.

THAWANI, A. et al. Zika virus can strongly infect and disrupt secondary organizers in the ventricular zone of the embryonic chicken brain. **Cell Rep.** v. 23, p. 692–700, 2018. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.080

Thézé, J. et al. Genomic epidemiology reconstructs the introduction and spread of Zika virus in Central America and Mexico. **Cell Host Microbe**, v. 23, pp. 855-864.e7, 2018.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Arch Virol** v. 61, p. 665–668, 2016. DOI 10.1007/s00705-015-2695-5

TOMICICH, R. G. P. et al. Epidemiologia do vírus da Língua Azul em rebanhos bovinos. **Embrapa Pantanal**, 25p., 2006.

TOMICICH, R. G. P. et al. Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e veados campeiros no Pantanal sul-matogrossense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.61, n.5, p.1222-1226, 2009.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. et al. Oropouche virus: clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected orthobunyavirus. **Am J Trop Med Hyg.** v. 96, p. 1019–30, 2017.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 9, p. 858-866, 1996.

UNEP. United Nations Environment Programme and International Livestock Research Institute (2020). **Preventing the Next Pandemic: Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission**. Nairobi, Kenya.

USLU, U.; DICK, B. Chemical characteristics of breeding sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae). **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 178-184, 2010.

VARGAS, L. The subgenera of *Culicoides* of the Americas (Diptera: Ceratopogonidae). **Revista de Biologia Tropical** v. 8, p. 35–47, 1960.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad Saúde Pública**. 17, p. 155–64, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 16, n. 5, p. 295-301, 2016.

VASILAKIS N, WEAVER SC. *Flavivirus* transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol.* v. 22, p. 30-35, 2017. doi: 10.1016/j.coviro.2016.11.007. **Epub** 2016 Dec 6. PMID: 27936448; PMCID: PMC5346038.

VEGA, S. et al. **Lengua Azul**. Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal. Universidad Cardenal Herrera –CEU. 46113 Moncada, 2005.

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

VENTER, G. J.; MEISWINKEL, R. The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in the colder, high-lying area of the eastern Orange Free State, South Africa, and its implications for the transmission of arboviruses. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 61, p. 327-345, 1994.

VERAS, R. S.; CASTELLÓN, E. G. Diversity and seasonality of species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Adolpho Ducke Forest Reserve, Brazilian Amazon. **Neotropica**, v. 44, p. 81-86, 1998b.

VERAS, R.; CASTELLÓN, E. G. *Culicoides* Latreille in Brazilian Amazon. V. Efficiency of traps and baits and vertical stratification in the forest reserve Adolpho Ducke. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 145-152, 1998a.

Veterinarians Without Borders / Vétérinaires Sans Frontières - Canada. **One Health for One World: A Compendium of Case Studies**. 2010:104 p.

VIRAKUL, P.; FAHNING, M. L.; JOO, H. S.; ZEMJANIS, R. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine virus diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. **Theriogenology**, Stoneham, v.29, p.441-449, 1988.

VITALE, G. C.; WIRTH, W.W.; AITKEN, T.H.G. New species and records of *Culicoides* reared from arboreal habitats in Panama, with a synopsis of the debilipalpis group (Diptera: Ceratopogonidae). **Proc Entomol Soc Wash** v. 83, p. 140-159, 1981.

VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 48, p. 85–90, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.014>.

WALLACE, R. et al. The dawn of Structural One Health: a new science tracking disease emergence along circuits of capital. **Soc. Sci. Med.**, v. 129, p. 68-77, 2014.

WALLER, J. R., LANCELOT, P.C. LEFEVRE AND M. KREMER. Note faunistique sur *Culicoides* de Guyane (Diptera: Ceratopogonidae). **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux** v. 43, n. 3, p. 349–364, 1990.

WALZ, P. H. et al. Control of bovine viral diarrhea virus in ruminants. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 24, p. 476-486, 2010.

WEAVER SC, REISEN WK. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res.** Feb; v. 85, n. 2, p. 328–45, 2010.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual review of medicine.**, n.69, p. 395-408, 2018.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 299, p. 285-314, 2006. doi:10.1007/3-540-26397-7_10

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends Microbiol.**, v. 21, n. 8, p. 360-363, 2013.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res.**, v. 85, n. 2, p. 328-45, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.

WEBER, M. N. et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with HoBi-like pestivirus in a field outbreak. **Transbound. Emerg. Dis.**, 2014, 10.1111/tbed.12223

WELLBY, M. et al. Effect of temperature on survival and rate of virogenesis of African horse sickness virus in *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) and its significance in relation to the epidemiology of the disease. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 86, p. 715–720, 1996.

WHO. **Especialistas debatem sobre o conceito 'Saúde Única' para reforçar a integração das vertentes humana, animal e ambiental na Saúde Pública.** <https://www.afro.who.int/pt/news/especialistas-debatem-sobre-o-conceito-saude-unica-para-reforcar-integracao-das-vertentes> . 2019. Acesso em outubro de 2019

WHO. World Health Organization [WHO] and Secretariat of the Convention on Biological Diversity [CBD] (2015). **Connecting global priorities: Biodiversity and human health – A state of knowledge review.** WHO and CBD: Geneva and Montreal.

<https://www.who.int/publications-detail/connectingglobal-priorities-biodiversity-and-human-health>

WHO. World Health Organization. **Dengue: Guidelines for treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization.** Library Cataloguing-in-Publication Data. New Edititon, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Acesso em: 14 de junho 2017.

WHO. World Health Organization. **Weekly epidemiological record**; 2017 Apr p. 12. Report No.: Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE): a global strategy, 2017–2026, 2017.

WHO. **Zika vírus, Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome.** World Health Organization (WHO), p.1-13. 2016.

WILSON, A. J.; MELLOR P. S., bluetongue in Europe: past, present end future. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 364, p. 2669–2681, 2009

WIRTH, W.W.; BLANTON, F.S. Biting midges of the Genus *Culicoides* from Panama (Diptera: Heleidae). **Proceedings of the United States National Museum** v. 109, p. 237–482, 1959. doi: 10.5479/si.00963801.109-3415.237

WOLFE, N. D. et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 64, p. 310–316, 2001.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, n. 11, p. 1842–1847, 2005. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050997>

WORWA, G. et al. Experimental transplacental infection of sheep with bluetongue virus serotype 8. **Vet Rec.** v. 164, n. 16, p. 499-500, 2009.

YADAV S, RAWAL G, BAXI M. Zika virus: an emergence of a new arbovirus. **J Clin Diagn Res.** 2016;10:DM01–3.

YOCKEY, L. et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. **Cell**. v. 166, p. 1247–56, 2016. e4. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.004

ZANELA, J. R. C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 51, n. 5, p. 510-519, 2016.

ZANELLA, G. et al. Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008–2009. **Theriogenology**. v. 77, n. 1, p. 65-72, 2012.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZARA, A.L.S.A.; SANTOS, S.M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S.; CARVALHO, R.G. COELHO, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol Serv Saúde**, v.25, n.2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, Z. et al. Zika virus induced more severe inflammatory response than dengue virus in chicken embryonic livers. **Front Microbiol**. v. 10, p. 1127, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01127

ZINSSTAG, J. et al. From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. **Prev Vet Med**. v. 101, n. 3-4, p. 148-56, 2011. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.07.003. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20832879; PMCID: PMC3145159.

APÊNDICE A



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 AGENCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGOCIOS
 INSTITUTO BIOLÓGICO

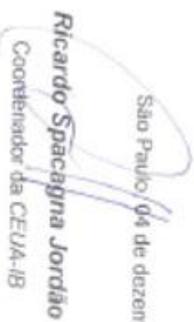
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 159/18 sobre o Projeto: "Estudo do vírus zika em bovinos com BVDV e BTV e sua interação com mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culiscoides* no Estado de São Paulo", sob a responsabilidade de **Linia Hiromi Okuda**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA)

Protocolo aprovado pela CEUA-IB em 21 de novembro de 2018.

São Paulo, 04 de dezembro de 2018


Ricardo Spacagna Jordão
 Coordenador da CEUA-IB

CEUA - IB

Registro

Número : 159/18

Livro : 02

Folha : 59

Data: 04/12/18



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

