

MAIRA DE SOUZA NUNES MARTINS

**VÍRUS SCHMALLEMBERG: UMA VIROSE DE RUMINANTES
EMERGENTE NA EUROPA EM 2011. DESENVOLVIMENTO DE
RECURSO DIAGNÓSTICO E PESQUISA DA CIRCULAÇÃO VIRAL
NO BRASIL**

São Paulo

2020

MAIRA DE SOUZA NUNES MARTINS

**VÍRUS SCHMALLEMBERG: UMA VIROSE DE RUMINANTES
EMERGENTE NA EUROPA EM 2011. DESENVOLVIMENTO DE
RECURSO DIAGNÓSTICO E PESQUISA DA CIRCULAÇÃO VIRAL
NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3966
FMVZ

Martins, Maira de Souza Nunes
Vírus Schmallenberg: uma virose de ruminantes emergente na Europa em 2011 – desenvolvimento de recurso diagnóstico e pesquisa da circulação viral no Brasil / Maira de Souza Nunes Martins. – 2020.
133 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Aborto. 2. Diagnóstico. 3. Bovino. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Vírus Schmallenberg: uma virose de ruminantes emergente na Europa em 2011. Desenvolvimento de recurso diagnóstico e pesquisa da circulação viral no Brasil", protocolada sob o CEUA nº 2892260716 (ID 005927), sob a responsabilidade de **Leonardo José Richtzenhain e equipe; Maira de Souza Nunes Martins** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/12/2018.

We certify that the proposal "Schmallenberg Virus: An emerging ruminant virus in Europe in 2011. Development of diagnostic resources and research on viral circulation in Brazil", utilizing 3000 Bovines (males and females), protocol number CEUA 2892260716 (ID 005927), under the responsibility of **Leonardo José Richtzenhain and team; Maira de Souza Nunes Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/12/2018.

Finalidade da Proposta: **Ensino (Aula Prática)**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **08/2020**

Área: **Biologia Molecular**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 9 anos**

N: **3000**

Linhagem: **diversas**

Peso: **0 a 700 kg**

Local do experimento: FMVZ/USP e Instituto Biológico de São Paulo

São Paulo, 28 de julho de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTINS, Maira de Souza Nunes

Título: Vírus Schmallenberg: Uma virose de ruminantes emergente na Europa em 2011.
Desenvolvimento de recurso diagnóstico e pesquisa da circulação viral no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Magda.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por sempre me guiar, me abençoar, iluminar meu caminho e me dar forças para sempre seguir em frente.

À minha mãe, *Magda*, pelo amor, dedicação, compreensão, apoio e por sempre estar do meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain*, pela confiança, pela oportunidade dada, pela orientação e colaboração no meu crescimento profissional.

À *Prof^a. Dra. Edviges Maristela Pituco*, Gerente Técnica do Laboratório de Referência Centro Panamericano de Febre Aftosa y Salud Pública Veterinaria (PANAFTOSA-OPAS/OMS) pela sua grande contribuição tanto com esta pesquisa como também em minha carreira científica, por sempre estar disponível quando requisitada por mim e por todos os ensinamentos.

Ao *Prof. Dr. Fábio Gregori*, departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelas sugestões dadas.

Ao *Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão*, departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelas sugestões dadas.

À *Dra. Sueli Akemi Taniwaki Miyagi*, Especialista em Laboratório do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), pela sua grande ajuda.

À pesquisadora *Dra. Liria Hiromi Okuda* e toda a equipe do Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico, por contribuir, mesmo que indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho.

À pesquisadora *Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro* e equipe do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico, pela parte bacteriológica.

Ao membros da banca examinadora, por contribuírem com essa pesquisa.

Aos funcionários, professores e colegas de curso do VPS pela contribuição ao meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado (Código de financiamento 88882.327996/2019-01).

EPÍGRAFE

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MARTINS, Maira de Souza Nunes. **Vírus Schmallerberg: uma virose de ruminantes emergente na Europa em 2011. Desenvolvimento de recurso diagnóstico e pesquisa da circulação viral no Brasil.** [Schmallerberg Virus: An emerging ruminant virus in Europe in 2011. Development of diagnostic resources and research on viral circulation in Brazil]. 2020. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Identificado pela primeira vez na Alemanha em 2011, o vírus Schmallerberg- SBV (gênero *Orthobunyavirus* sorogrupo Simbu) é um RNA vírus emergente, com forte repercussão em países europeus assim como em alguns asiáticos e africanos. A infecção é relatada especialmente em ruminantes e sua transmissão é feita principalmente por *Culicoides* spp., ou verticalmente *in utero*. As manifestações clínicas são caracterizadas por aborto, malformações congênitas e natimortos. O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, é um dos maiores exportadores de carne e a presença de potenciais vetores do SBV é muito abundante em todo território nacional. Não obstante estas duas importantes características, a literatura compulsada até o presente momento não relata o estabelecimento no Brasil de metodologia diagnóstica, bem como qualquer informação laboratorial sobre a circulação do SBV no rebanho bovino brasileiro. Assim, o objetivo do presente estudo foi padronizar e validar um método direto de detecção do SBV baseado na Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (RT-qPCR) e obter os primeiros dados laboratoriais sobre a eventual circulação do SBV no Brasil em amostras clínicas colhidas no período de 2011 a 2019. Adicionalmente foram também pesquisados anticorpos anti SBV empregando um kit de ELISA comercial. A RT-qPCR foi padronizada e validada utilizando *primers* e sonda que amplificam o segmento S do genoma do SBV. Por motivos de biossegurança, como controle positivo foi construída uma sequência sintética desse segmento, clonada no plasmídeo pTZ57R e propagada em *E. coli* (estirpe JM109). Foram analisadas 1665 amostras de sangue total e 313 amostras de pool de órgão de fetos abortados para pesquisa direta do SBV além de 596 amostras de soro para a pesquisa indireta. Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando cador[®]Pathogen 96 QIAcube[®] HT conforme o manual do fabricante. As amostras de sangue total e fetos foram amplificadas pela RT-qPCR padronizada e validada. A análise sorológica foi realizada por ELISA indireto (ID Screen[®] Schmallerberg virus Indirect Multi-species- IDvet). A RT-qPCR padronizada apresentou sensibilidade analítica de 1 cópia de RNA/μL. Todas as amostras clínicas analisadas por RT-qPCR e ELISA foram negativas para o SBV. O Brasil é destaque na pecuária bovina e apesar de ter condições favoráveis para a disseminação do SBV, os dados

obtidos sugerem que o SBV não circulou na população bovina estudada em território brasileiro. Manter condição de livre para essa doença é fundamental para evitar as perdas decorrentes da infecção, bem como aquelas decorrentes de barreiras internacionais impostas pelos países importadores. O presente estudo contribuiu para o estabelecimento de estrutura diagnóstica e trouxe as primeiras informações objetivas sobre a circulação do SBV no Brasil, fatos de extrema importância para a Defesa Sanitária e para atender às exigências de mercados internacionais.

Palavras-chave: Aborto. Diagnóstico. Bovino.

ABSTRACT

MARTINS, Maira de Souza Nunes. **Schmallenberg Virus: An emerging ruminant virus in Europe in 2011. Development of diagnostic resources and research on viral circulation in Brazil** [Vírus Schmallenberg: uma virose de ruminantes emergente na Europa em 2011. Desenvolvimento de recurso diagnóstico e pesquisa da circulação viral no Brasil]. 2020.133 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

First identified in Germany in 2011, Schmallenberg virus -SBV (genus *Orthobunyavirus* serogroup Simbu) is an emerging RNA virus, with strong repercussions in European countries as well as in some Asians and Africans. The infection is reported especially in ruminants and is transmitted mainly by *Culicoides* spp., or vertically *in utero*. Clinical manifestations are characterized by abortion, congenital malformations and stillbirths. Brazil has one of the largest cattle herds in the world, is one of the largest meat exporters and the presence of potential vectors of the SBV is very abundant throughout the national territory. Despite these two important characteristics, the literature required to date does not report the establishment in Brazil of diagnostic methodology, as well as any laboratory information on SBV circulation in the Brazilian cattle herd. Thus, the objective of the present study was to standardize and validate a direct method of SBV detection based on Reverse Transcription followed by Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and to obtain the first laboratory data on the eventual SBV circulation in Brazil in clinical samples collected in the period from 2011 to 2019. In addition, anti-SBV antibodies were also searched using ELISA kit (ID Screen[®] Schmallenberg virus Indirect Multi-species- IDvet). RT-qPCR was standardized and validated using primers and probes that amplify the S segment of the SBV genome. For biosecurity reasons, for positive control was constructed a synthetic sequence of this segment, cloned in plasmid pTZ57R and propagated in *E. coli* (strain JM109). 1665 samples of whole blood and 313 samples of organ pools from aborted fetuses were analyzed for direct SBV research, in addition to 596 serum samples for indirect screening. Nucleic acids were extracted using a Cador[®]Pathogen 96 QIAcube[®] HT according to the manufacturer's manual. The whole blood and fetus samples were amplified by the standardized and validated RT-qPCR. Serological analysis was performed by commercial indirect ELISA. The standardized RT-qPCR showed analytical sensitivity of 1 copy of RNA / μ L. All clinical samples analyzed by RT-qPCR and ELISA were negative for SBV. Brazil stands out in cattle livestock and despite having favorable conditions for the spread of SBV, the data obtained suggest that SBV did not circulate in the studied bovine population in Brazilian territory. Maintaining a free condition for this disease is essential to

avoid losses due to infection, as well as those resulting from international barriers imposed by importing countries. The present study contributed to the establishment of a diagnostic structure and brought the first objective information on the circulation of the SBV in Brazil, facts of extreme importance for the Sanitary Defense and to meet the demands of international barriers.

Keywords: Abortion. Diagnosis. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Árvores filogenéticas dos segmentos (a) pequeno (b) médio e (c) grande dos vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu, atrelados com os vírus dos sorogrupos Bunyamwera e California. As árvores foram geradas por máxima verossimilhança e bootstrap 1000 replicatas. A barra de escala indica o número estimado de substituições de nucleotídeos/sítio.....28
- Figura 2:** Distribuição espacial do SBV entre 2011 e 2012 e do BTV-8 em 2006. Os dados mostrados são para os primeiros 121 dias de ambos os surtos. A inclusão mostra detalhes da área afetada por BTV-8. Mapa criado com o software ArcGISE® da ESRI.....32
- Figura 3:** Culicídeos sp e padrões das asas de espécies presentes na Irlanda e no Reino Unido. (1) *C. obsoletus*/ *C. scoticus*, (2) *C. chiopterus*, (3) *C. dewulfi*, (4) *C. pulicaris*, (5) *C. punctatus*. Imagens cedidas pelo Instituto Pirbright.41
- Figura 4:** Morfologia de vírions do vírus Schmallenberg em seção ultrafina (A), morfologia e organização do genoma de bunyavírus (B).50
- Figura 5:** Esquema partícula bunyavírus (A) e dos três segmentos de RNA (S, M e L) do SBV(B).51
- Figura 6 :** Mapa de restrição do vetor pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit- Thermo Fisher Scientific)..... 68
- Figura 7:** Sequência de nucleotídeos do gBlocks® (823 pb) desenhado para o desenvolvimento do controle positivo padrão para os métodos moleculares de detecção do SBV...83
- Figura 8:** PCR das colônias brancas com o primer M13. M: marcador de tamanho molecular 100 pb; colunas 1 ao 11: reações positivas com banda na altura esperada de aproximadamente 966 pb; coluna 12: controle negativo.....84
- Figura 9:** Digestão dos plasmídeos recombinantes com a enzima EcoRI . M: marcador de tamanho molecular 1kb; colunas 1 a 4 plasmídeo linear digerido com banda que corresponde ao tamanho do plasmídeo pTZ57R/T de 2847 pb mais o inserto de 813 pb.85
- Figura 10:** Curva de amplificação qPCR do controle de qualidade da degradação do DNA residual e integridade do RNA. Diluições do 10^{-1} ao 10^{-4} tanto do cDNA como do RNA, todos em duplicata. Rn: fluorescência do corante repórter dividida pela fluorescência de um corante de referência passivo..... 86
- Figura 11:** Região de hibridação dos primers e da sonda de hidrólise referente ao strain BH80/11-4, número de acesso no GenBank HE649914.1.88
- Figura 12:** Gradiente de concentração dos primers forward e reverse com concentração de RNA viral de 10^3 cópias de RNA/ μ L.89
- Figura 13:** Gradiente de concentração dos primers forward e reverse em conjunto com a sonda de hidrólise e com concentração de RNA viral de 10^3 cópias de RNA/ μ L..... 90

Figura 14: Curvas de amplificação das diluições do vírus padrão nas concentrações 10^6 a 10^0 cópias de RNA/ μ L.	91
Figura 15: Curva padrão RT-qPCR para SBV, concentrações 10^6 a 10^0 cópias de RNA/ μ L. Valores da reação: Erro= 0,01; Eficiência=1,98; Slope= -3,365.....	92
Figura 16: Distribuição espacial das amostras de sangue total, fetos abortados e soro analisadas. A inclusão mostra detalhes da área onde as amostras de soro foram coletadas. Mapa criado pelo Google Maps.....	93
Figura 17: Distribuição por estados do Brasil das amostras de pool de órgãos analisadas.....	94
Figura 18: Contagem do número de espécies analisadas dos fetos abortados e natimortos. ..	95
Figura 19: Distribuição das amostras de órgãos de fetos abortados e natimortos por ano de coleta.....	95
Figura 20: Idades das mães dos fetos abortados e natimortos. NI: não informado.....	96
Figura 21: Estágio gestacional dos fetos analisados. NI: não informado.....	96
Figura 22: Prevalência de aborto nas propriedades das amostras de fetos analisadas.NI: não informado.....	97
Figura 23: Distribuição por tipo de criação das amostras de pool de órgãos analisadas. NI: não informada.	97
Figura 24: Distribuição por tipo de exploração das propriedades provenientes amostras de pool de órgão analisadas. NI: não informada.	98
Figura 25: Amplificação das amostras negativas contaminadas com SBV 10^3 cópias de RNA/ μ L. Cq de aproximadamente 24. Valores da reação: Erro= 0,02; Eficiência= 1,98; Slope= -3,359	99
Figura 26: Distribuição por agente abortivo das amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de concentração dos primers forward e reverse em nM.	73
Tabela 2: Gradiente de concentração da sonda de hidrólise em conjunto com as melhores concentrações dos primers em nM.	73
Tabela 3: Número de cópias de RNA por microlitro das diluições do vírus padrão empregadas na padronização e curva padrão da RT-qPCR para detecção direta do SBV.	87
Tabela 4: Diluições do RNA padrão, média do Cq de cada diluição e concentração do RNA por microlitro em cada diluição.	92
Tabela 5: Resultado do exame virológico e de Neospora caninum das amostras de pool de órgãos pela técnica de PCR. NI: não informado.....	99
Tabela 6: Resultado exame bacteriológico das amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos.	100
Tabela 7: Densidade ótica (DO) e porcentagem de inibição (%I) de cada amostra analisada para BTV.	101

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Sequência dos primers e sonda de hidrólise, localização da região de hibridação e tamanho do amplificado. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência referência presente no GenBank número de acesso: HE649914.172
- Quadro 2:** Número de animais amostrados por idade das fêmeas e tipo de aptidão do rebanho.76
- Quadro 3:** Classificação, espécies criadas, quantidade de animais, tipo, tamanho, idade e número de animais coletados de cada propriedade. ha: hectares.....77
- Quadro 4:** Condições de ciclagem e temperatura de amplificação RT-qPCR para SBV.79
- Quadro 5:** Sequência dos primers e sonda de hidrólise e tamanho do amplificado do gene endógeno.....79

LISTA DE SIGLAS ABREVIATURAS

μg.....	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
aa.....	Aminoácidos
Ac	Anticorpo
ADAF	Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas
AINOV	Vírus Aino
AKAV.....	Vírus Akabane
AM.....	Amazonas
BHK.....	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BoHV-1	Herpes Vírus Bovino Tipo 1
BSA	Albumina sérica bovina
BTV	Vírus da Língua Azul/ Blue Tongue Virus
BVD.....	Diarreia Viral Bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cDNA.....	Ácido desoxirribonucleico complementar
CI	Intervalo de confiança
Cq	Quantification cycle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Densidade óptica
DOUV.....	Vírus Douglas
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid

EHD Doença Hemorrágica Epizoótica

ELISA..... Ensaio de Imunoabsorção Enzimática/ *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*

FAM 6- carboxy-fluorescein

FLI Instituto Friedrich-Loeffler

g Gramas

h Horas

ha Hectares

HEX 5- Hexachloro-Fluorescein

IBGE..... Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN..... InterferonI

IPTG Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

KC..... *Culicoides variipennis larvae*

KCl Cloreto de potássio

kDa Quilodalton

kg Quilogramas

km..... Quilômetros

MAPA..... Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂ Cloreto de magnésio

min Minutos

mL..... Mililitro

mm Milímetro

mM Milimolar

mol/L Mol por litro

NaCl..... Cloreto de Sódio

n°..... número

nm..... Nanômetro

nM..... Nanomolar

NoLS..... Localização nucleolar

OEG Ovos embrionados de galinha

OIE Organização Mundial da Saúde Animal

ORF *Open reading frame*

pb Pares de base

PCR..... Reação em cadeia da polimerase /*Polymerase chain reaction*

pH Potencial hidrogeniônico

PIB Produto Interno Bruto

q.s.p..... Quantidade suficiente para

qPCR..... Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA..... Ácido ribonucleico

RNAm..... Ácido ribonucleico mensageiro

RNP Ribonucleoproteína

rpm..... Rotação por minuto

RT-qPCR Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa

s..... Segundos

SATV Vírus Sathuperi

SBV Vírus Schmallerberg

SHAV Vírus Shamonda

SK-6..... Swine Kidney-6

SNC Sistema nervosa central

sp..... Espécie

SP..... São Paulo

spp..... Várias espécies
U Unidades
USDA United States Department of Agriculture
VERO Verda Reno cell
VN Vírusneutralização
x g Força centrífuga

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius

°N graus Norte

® Marca registrada

% porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 ETIOLOGIA	26
3.2 EPIDEMIOLOGIA	29
3.3 CICLO REPLICATIVO	37
3.4 TRANSMISSÃO	38
3.4.1 Gênero <i>Culicoides</i> Latreille (Diptera; Ceratopogonidae).....	40
3.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	44
3.6 PATOGENESE.....	45
3.7 ACHADOS DE NECROPSIA.....	47
3.8 ACHADOS HISTOLÓGICOS	48
3.9 ESTRUTURA, ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS	49
3.10 DIAGNÓSTICO	55
3.10.1 Diagnóstico Clínico e Anatomopatológico.....	55
3.10.2 Diagnóstico Laboratorial	56
3.11 CONTROLE, TRATAMENTO E PROFILAXIA.....	59
3.12 IMPACTO	60
3.13 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO DO SBV	67
4.1.1 Desenvolvimento Controle Positivo.....	67
4.1.2 Padronização e Validação da RT-qPCR.....	71
4.2 AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO SBV NO BRASIL	75
4.2.1 Seleção das Amostras	75
4.2.2 Diagnóstico Direto.....	78
4.2.3 Diagnóstico Indireto	81
4.2.4 Análise Estatística	82
5 RESULTADOS	83
5.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA RT-qPCR PARA DETECÇÃO DO SBV	83
5.1.1 Desenvolvimento Controle Positivo.....	83
5.1.2 Padronização e Validação da RT-qPCR.....	87

5.2	AVALIAÇÃO DA CIRCULÇÃO DO SBV NO BRASIL	93
5.2.1	Pesquisa RNA do SBV por RT-qPCR.....	94
5.2.2	Diagnóstico Diferencial de Fetos Abortados.....	99
5.2.3	Pesquisa de anticorpos anti- SBV por ELISA.....	101
5.2.4	Análise Estatística	102
6	DISCUSSÃO	103
7	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS	119

1. INTRODUÇÃO

O Brasil em 2018 possuía um rebanho bovino efetivo de cerca de 214,7 milhões de cabeças segundo IBGE (2018) e 232 milhões de cabeças segundo USDA (2019), o que corresponde a aproximadamente 22,6% do total de bovinos do planeta. Variando entre primeiro e segundo lugar como um dos maiores rebanhos efetivos do mundo, possui desenvolvimento de dois segmentos lucrativos, as cadeias produtivas da carne e leite. É considerado também como um dos maiores produtor e exportador de carne bovina no mundo, também variando entre o primeiro e segundo lugar. A agropecuária brasileira se destaca como o setor que mais contribui para o fortalecimento da economia nacional, respondendo individualmente por cerca de 25% do Produto Interno Bruto (PIB). Em 2018, a participação do PIB da pecuária correspondeu a 8,7% do PIB total brasileiro. Essa contribuição pode ser ainda maior e mais decisiva se forem removidos os entraves que hoje limitam a produtividade e a competitividade desse segmento, em particular as atividades de exportação, que tem sua confiabilidade baseada na sanidade animal (IBGE, 2017; MAPA, 2018; UDSA, 2019).

Projeções do Agronegócio Brasil 2016/17 a 2026/27 indicam um aumento de 3% ao ano nas exportações, prevendo assim que o Brasil, ao final de 2027, continue como destaque no comércio de carne bovina do planeta. Dados do relatório socioeconômico para o Brasil, projetaram que até o ano de 2050 a população mundial chegue a 9,1 bilhões de habitantes, além de estimar um aumento de 42% no consumo per capita mundial de carnes até 2030, ficando em torno de 43-45 Kg/Pessoa/Ano (MAPA, 2018).

Números como esses revelam a necessidade de avanços da pesquisa agropecuária no setor, além do investimento em tecnologia e capacitação profissional, desenvolvimento de políticas públicas, controle da sanidade animal e segurança alimentar, os quais contribuem para que o país atenda às exigências dos mercados rigorosos.

Aproximadamente 30% das doenças infecciosas que surgiram entre 1990 a 2000 são arboviroses, resultado de uma combinação de fatores, incluindo um aumento significativo nas trocas comerciais e de viagem, mudanças climáticas e ecológicas e aumento da produção pecuária. Uma mudança simultânea ocorreu no número de animais transportados através das fronteiras políticas sendo que a consequência não intencional dessas mudanças tem sido a aparição de doenças multifatoriais (ROTOLO; MAIN; ZIMMERMAN, 2018).

Além disso, essas mudanças criaram condições ideais para o movimento de hospedeiros vertebrados infectados e vetores invertebrados em amplas áreas geográficas, como é o caso do

vírus Schmallenberg (SBV), uma arbovirose emergente na Europa em 2011, transmitida principalmente por *Culicoides* spp. e que causa malformações congênitas, abortos e natimortos quando vacas prenhes são infectadas (VARELA et al., 2013).

Ponderando-se a importância da pecuária bovina na economia nacional, baseada nos indicadores e nos valores expressivos oriundos da atividade do agronegócio, torna-se fundamental a adoção de medidas para contribuir com a vigilância sanitária dos rebanhos, com ênfase no diagnóstico diferencial de fetos abortados, que coopera de forma significativa no incremento da produtividade no setor.

Em que pese a presença de potenciais vetores do SBV no Brasil, fator de capital importância na sua epidemiologia, devido a inexistência de recursos diagnósticos estabelecidos no Brasil até o momento, não é realizado diagnóstico, pesquisa ou vigilância do SBV no Brasil, assim como são desconhecidos a ocorrência e o impacto deste como causa de malformação congênita, natimortos e na queda da produção de leite em animais brasileiros.

Portanto, estudos que visem estabelecer técnicas diagnósticas para realizar vigilância e avaliar a situação epidemiológica nacional do SBV e, se detectado em tempo oportuno, caracterizar as amostras e tomar as providências necessárias para conter a disseminação, são medidas fundamentais para pecuária brasileira, para evitar perdas na produção e manter mercados internacionais abertos.

Este trabalho além de ampliar e disseminar o conhecimento sobre esta infecção, é importante para contribuir para a melhoria da qualidade sanitária dos bovinos, visando o incremento à produtividade dos rebanhos, auxiliando os órgãos de defesa sanitária na tomada de medidas específicas de combate a doenças. A valorização e a qualificação dos serviços da defesa sanitária animal são fundamentais para o processo de avaliação e certificação da condição sanitária dos rebanhos e pilares para o reconhecimento zoonosológico internacional.

2. OBJETIVOS

Gerais

O presente trabalho tem por objetivo estabelecer diagnóstico laboratorial do SBV no Brasil e investigar pela primeira vez a sua ocorrência no território nacional.

Específicos

- 1- Desenvolver um controle positivo padrão para diagnóstico molecular do SBV;
- 2- Padronizar e validar reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) para detecção do SBV;
- 3- Pesquisar a ocorrência do SBV no Brasil por meio de detecção do RNA do SBV em amostras de fetos abortados e natimortos de ruminantes pertencentes a um banco de conveniência assim como em amostras de sangue total de bovinos criados em dois municípios do Brasil e arredores;
- 4- Pesquisar a ocorrência de anticorpos contra o SBV em bovinos criados no município de Humaitá (estado do Amazonas/ Brasil)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O vírus Schmallerberg (SBV) foi reportado pela primeira vez no verão e outono de 2011 na Renânia do Norte-Vestefália (Alemanha) e Holanda, onde agricultores e veterinários relataram a ocorrência, em bovinos leiteiros, de uma doença de curto período de manifestações clínicas e não identificada. Por meio de análise molecular e abordagem metagenômica de amostras de sangue desses animais, o Instituto Friedrich-Loeffler (FLI) detectou um novo *Orthobunyavirus* denominado vírus Schmallerberg (espécie *Schmallerberg orthobunyavirus*), nome da cidade do primeiro registro da doença (HOFFMANN et al., 2012).

3.1 ETIOLOGIA

O SBV é um RNA vírus de cadeia simples sentido negativo e segmentado, esférico, com proximamente 80 a 120 nm diâmetro e envelopado (FISCHER et al., 2013b; WERNIKE et al., 2014). Pertence a ordem *Bunyvirales*, família *Peribunyviridae*, gênero *Orthobunyavirus* (ICTV, 2019).

A partir de fevereiro de 2019, a ordem *Bunyvirales* consiste em 46 gêneros atribuídos a 12 famílias, sendo que os vírus desta ordem infectam vertebrados, com a exceção de tospovírus, que infectam plantas. Contém agentes patogênicos tanto de seres humanos como outros animais, inclui doenças febris (vírus Oropouche), encefalites (vírus La Crosse) e febres hemorrágicas (vírus da febre do Vale do Rift) (VARELA et al., 2013; ICTV, 2019).

A família *Peribunyviridae* atualmente é composta por 4 gêneros, sendo um deles o *Orthobunyavirus* que contém pelo menos 88 espécies virais, algumas de relevância médico veterinária e diversas em termos geográficos de distribuição, vetores e hospedeiros (ICTV, 2019). São divididos em 18 sorogrupos baseados nas relações antigênicas em testes sorológicos como inibição de hemaglutinação cruzada, fixação do complemento e neutralização de anticorpos. O sorogrupo Simbu, o qual o SBV pertence, compreende 32 vírus isolados dos quais 28 tiveram seu genoma completo sequenciado. Inclui os vírus Shamonda (SHAV), Akabane (AKAV), Aino (AINOV), Sathuperi (SATV) e Douglas (DOUV) sendo que os dois últimos são os mais geneticamente relacionados ao SBV (Figura 1) e nenhum desses vírus foram detectados na Europa até o momento (OIE, 2019; FISCHER et al., 2013b; WERNIKE et al., 2014).

O SHVA foi primeiramente isolado em bovinos e *Culicoides* sp na Nigéria na década de 1960, sendo que somente em 2002 emergiu no Japão, com isolamento em *Culicoides* sp e

bovinos sentinela. O Japão foi considerado endêmico para vários vírus do sorogrupo Simbu em bovinos desde 1970 (ELBERS et al., 2012a).

O AKAV foi primeiramente isolado em bovinos e *Culicoides* sp no Japão em 1959 e relatado desde então em zonas climáticas tropicais e temperadas na África, Ásia, Austrália e Oriente Médio. É responsável por abortos, natimortos, partos prematuros e malformações congênitas em recém-nascidos provocando doença subclínica ou assintomática em animais adultos não prenhes, sendo que ovelhas e cabras são mais susceptíveis entre 28 e 56 dias de gestação. Os surtos de malformações congênitas ocorrem quando as condições ambientais permitem que os mosquitos se dispersem para além do seu alcance normal, onde as populações de animais suscetíveis estão presentes ou quando condições climáticas adversas impedem que os vetores circulem dentro de uma parte do seu intervalo de distribuição normal por algum tempo, dando origem a bovino suscetível, como também o movimento permanente ou temporal de animais em uma área vetorial, dinâmica essa muito próxima do SBV (DE REGGE, 2017; LALOY et al., 2017a).

O AINOV também foi isolado em bovinos primeiramente no Japão em 1964 e somente foi reconhecido como uma grande epizootia em 1995-1996 quando seu papel etiológico foi confirmado e sua distribuição parece ser similar a AKAV (DE REGGE, 2017).

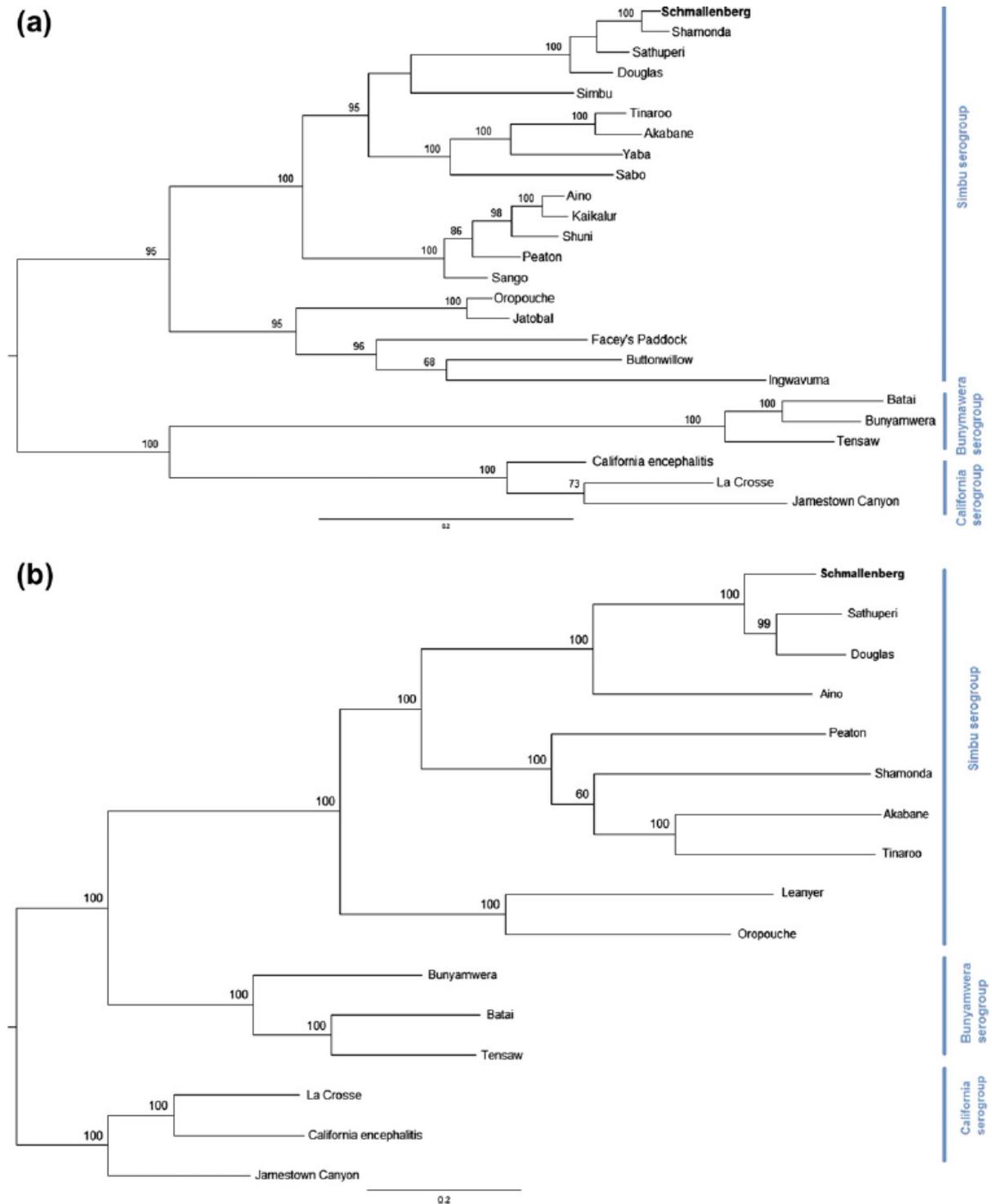
O SATV foi inicialmente isolado a partir de mosquitos da Índia em 1957 e a partir de então somente foi detectado em regiões tropicais, como também e mais recentemente no Japão. Até o momento, não há relatos que o associe a qualquer doença em animais incluindo humanos (YANASE et al., 2004).

O DOUV foi relatado inicialmente em *Culicoides* sp e bovinos na Austrália em 1979 e ainda não houve evidencia como causa de doença em animais incluindo humanos (CYBINSKI, 1984).

Os membros do sorogrupo Simbu foram associados a abortos, natimortos e malformações congênitas em ruminantes na Ásia, África e Oceania, sendo que não foram detectados na Europa antes da primeira detecção do SBV e este não foi encontrado em amostras arquivadas até 2011, indicando que, provavelmente, a primeira introdução do SBV na Europa tenha ocorrido na primavera de 2011 (VARELA et al., 2013).

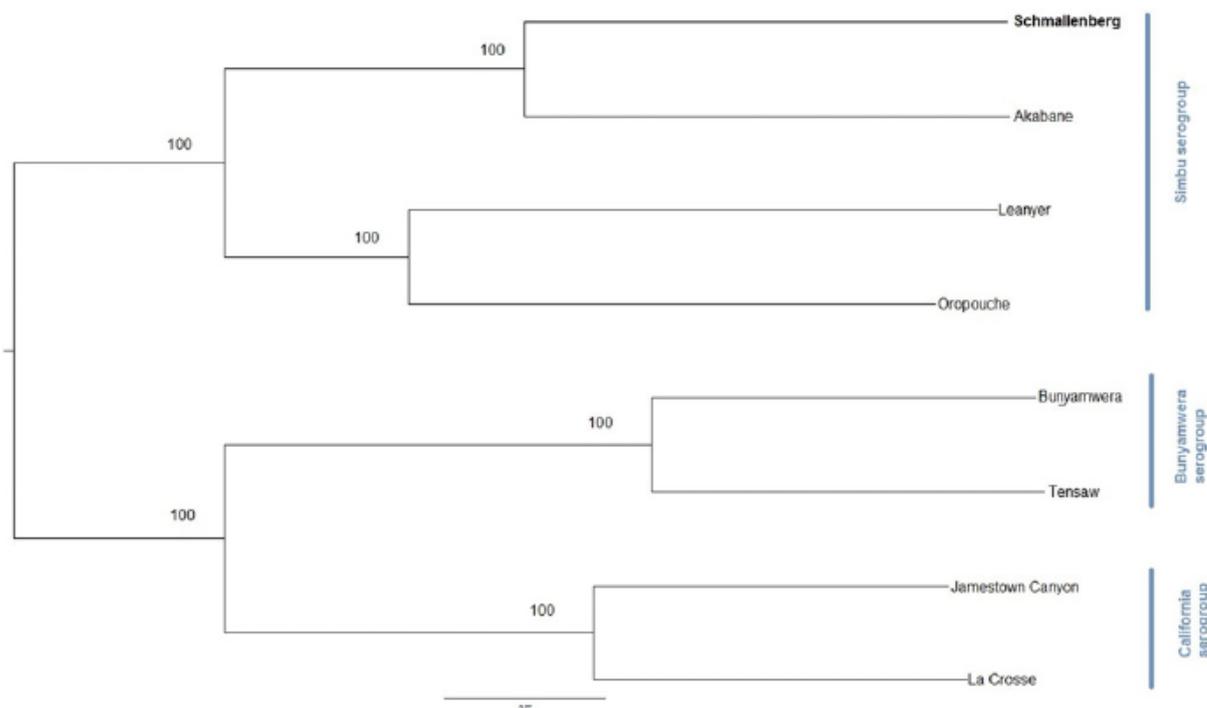
O SBV tem sua infectividade significativamente reduzida ou perdida a 50-60°C durante, pelo menos, 30 minutos. É suscetível a desinfetantes comuns como, por exemplo, hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, etanol a 70% e formaldeído. É um vírus sensível e não sobrevive fora do hospedeiro ou vetor por longos períodos (OIE, 2019).

Figura 1: Árvores filogenéticas dos segmentos (a) pequeno (b) médio e (c) grande dos vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu, atrelados com os vírus dos sorogrupos Bunyamwera e California. As árvores foram geradas por máxima verossimilhança e bootstrap 1000 replicatas. A barra de escala indica o número estimado de substituições de nucleotídeos/sítio.



continua.

(c)



Fonte: TARLINTON et al., 2012.

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A história e as origens geográficas do SBV não são claras e permanecem desconhecidas. Embora o SBV tenha sido descrito recentemente, provavelmente sua origem é mais antiga e ele pode ter coevoluído com outros vírus intimamente relacionados. Dados epidemiológicos e estudos sobre os vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu são precários, o que dificulta essa análise. Nesse sentido, a detecção, isolamento e caracterização dos vírus do sorogrupo Simbu em outras regiões do mundo são necessários para determinar se um vírus intimamente relacionado ao SBV circula em uma região específica (TIWARI et al., 2018).

Uma teoria é que o SBV pode ter sido introduzido por meio de insetos importados com um animal infectado ou flores colhidas na África. Também há a possibilidade que o vírus estivesse circulando de forma latente (em um hospedeiro reservatório, por exemplo) e causou doença clínica quando houve a expansão da faixa de seus vetores dando origem à infecção de hospedeiros totalmente suscetíveis (TARLINTON et al., 2012).

Na Alemanha antes de 2011, não houve evidência da ocorrência do SBV em ruminantes, baseado em um estudo retrospectivo de 1961 a 2010 (GERHAUSER et al., 2014).

Em julho de 2006 na região de Onderstepoort (província de Mpumalanga, África do Sul), em uma análise retrospectiva, foi detectado casos de cordeiros com manifestações clínicas relacionadas à infecção por SBV, filhos de uma ovelha que pertencia a um rebanho de 45 animais. Não foi realizado um diagnóstico definitivo na época, pois os registros de vacinação estavam atualizados e não haviam manifestações clínicas nas ovelhas durante a gravidez (LEASK et al., 2012).

Em maio de 2008 na região de Delmas (província de Mpumalanga, África do Sul), agricultores relataram o nascimento de cordeiros com malformações congênitas (seis de aproximadamente 50 ovelhas deram à luz a cordeiros com graus variados de artrogripose, torcicolo, cifose, braquignatia mandibular e hidrocefalia). Na época, suspeitou-se como causa Língua Azul (BTV), doença de Wesselsbron, febre do Vale do Rift e vírus Middelburg. Foram descartadas como causa a Febre do Vale do Rift (ausência de lesões patológicas) e vírus Middelburg (devido a raridade e não ser diagnosticada em pequenos ruminantes, somente em cavalos). Esses animais foram testados para detecção de anticorpos contra os vírus Wesselsbron, Akabane e BTV, sendo que todas as amostras não foram reagentes. Também, na mesma época, agricultores relataram as mesmas deformidades em animais de outras fazendas a poucos quilômetros de distância, porém esses casos não foram investigados (LEASK et al., 2012).

Cogitou-se então que a causa era possivelmente uma nova cepa do vírus Akabane, embora não houvesse como confirmá-la. A presença de vírus relacionados ao SBV, como Akabane, estão presentes na África do Sul. Atualmente, com a descoberta do SBV, é possível que este seja a causa dessas ocorrências e que esteja presente na África do Sul desde então sem ser identificado e os casos de surtos foram erroneamente atribuídos ao vírus Akabane. Vale ressaltar que o material das amostras não está mais disponível para confirmar se tratava-se do SBV ou não e que testes de diagnósticos para SBV não estão disponíveis na África do Sul (LEASK et al., 2012).

Ainda, outro estudo sorológico retrospectivo na Turquia sugeriu que um búfalo em 2006 e um búfalo e doze vacas em 2007 foram soropositivas para SBV por ELISA, mas o genoma viral somente foi detectado em um bezerro e dois carneiros malformados em junho de 2012, sugerindo assim a presença precoce do SBV na Turquia antes dos surtos ocorridos na Europa (AZKUR et al., 2013).

Em Mocambique em 2013 foi identificada uma alta prevalência de anticorpos contra o SBV em bovinos, ovinos e caprinos adultos, mas sem manifestações clínicas, o que pode indicar

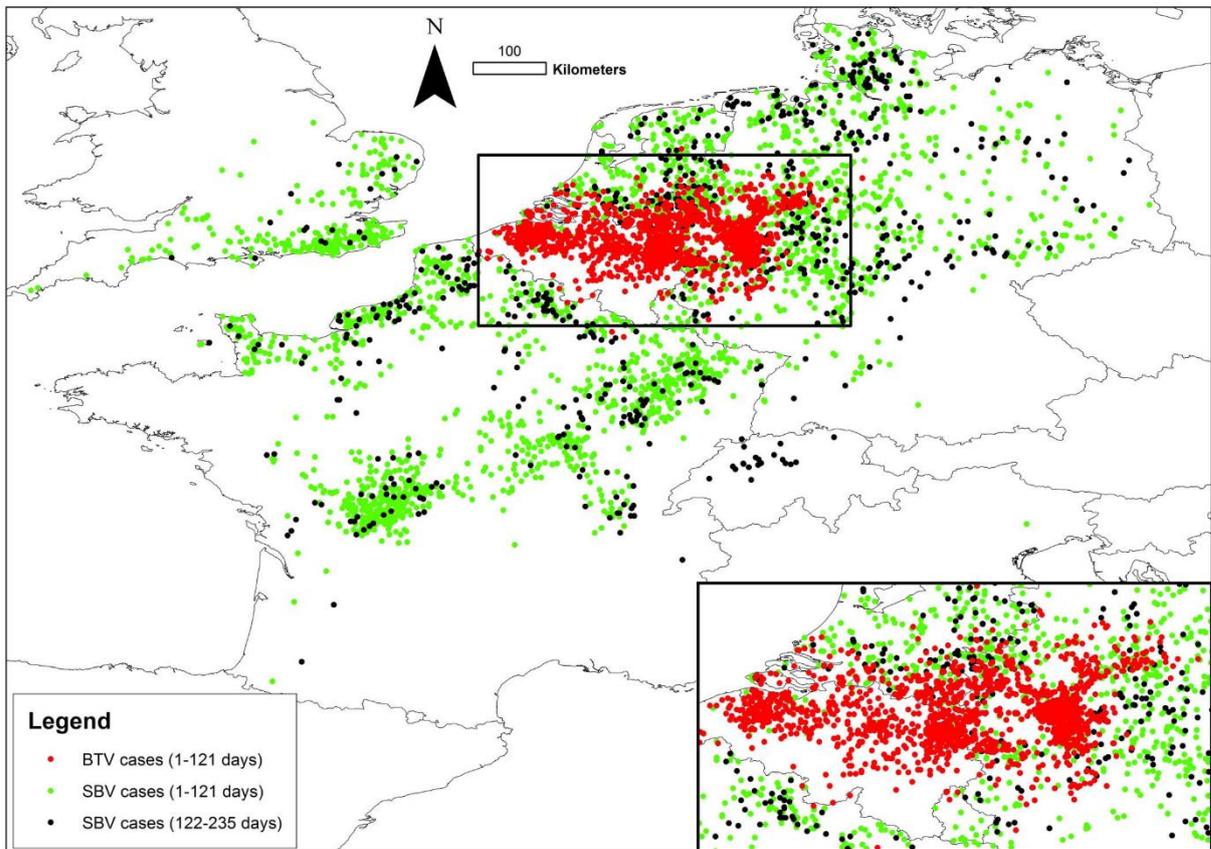
exposição contínua dos animais ao SBV na região (BLOMSTRÖM et al., 2014; LIEVAART-PETERSON et al., 2015).

No entanto, extensos estudos sobre o SBV por uma aliança de institutos de pesquisa veterinária de cinco países, incluindo Instituto Friedrich-Loeffler (FLI) na Alemanha, Centro de Pesquisa Veterinária e Agrotóxica (VAR-CODA-CERVA) na Bélgica, L' Agence Nationale Chargée de la Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) na França, Agência de Saúde Animal e Laboratórios Veterinários (AHVLA) no Reino Unido e Instituto Central Veterinário na Holanda, concluíram que a origem do SBV permanece desconhecida (LIEVAART-PETERSON et al., 2015).

Na Europa, o surto inicial do SBV começou na mesma área onde o Língua Azul sorotipo 8 (BTV-8) surgiu em 2006 (5 anos antes), ambos iniciaram no final do verão (julho para BTV-8 e agosto para SBV), podendo supor que o SBV e o BTV-8 foram introduzidos na Europa por uma rota semelhante, mas ainda não definida. No entanto, o SBV se espalhou muito mais rapidamente do que o BTV em 2006, afetando áreas muito maiores sendo que sua distribuição geográfica aumentou de forma constante (figura 2) afetando praticamente todos os países da Europa (SEDDA; ROGERS, 2013). Várias possibilidades tentam explicar essa diferença de disseminação: existem rotas adicionais de transmissão para o SBV, a faixa de hospedeiros do SBV é mais ampla, a dose infecciosa, existe diferença na competência de *Culicoides* para transmitir os dois vírus, não foram tomadas medidas legais para a contenção da disseminação do SBV como foi o caso do BTV-8 (MÉROC et al., 2014).

Embora SBV e BTV-8 sejam agentes distintos, ambos são transmitidos pelo mesmo vetor *Culicoides* sp. Alguns trabalhos relatam o possível papel do vento na disseminação do BTV na Europa e em outros lugares, pelo pequeno tamanho do corpo do vetor (1 a 3 mm de comprimento) o que possibilita voo passivo sobre a terra e corpos de água por centenas de quilômetros sob certas condições de temperatura, precipitação, umidade e velocidade do vento sendo que pode permanecer no ar por mais de 12 h. Estima-se que as espécies de *Culicoides* tenham um alcance de voo de até 5 km em alguns dias. Das formas possíveis de propagação do BTV, somente o transporte de *Culicoides* por ventos parecem capazes de explicar a direção e a extensão do surto em 2006 na Europa. Investigando-se uma possível introdução do SBV na Irlanda, por meio de modelos matemáticos e análises sorológicas, identificou-se uma potencial incursão do SBV no território pelo transporte de *Culicoides* por ar de longo alcance, o que resultou em um surto de SBV na Irlanda em agosto de 2012 (GLOSTER et al., 2006; MCGRATH; MORE; NEILL, 2012; BURGİN et al., 2013).

Figura 2: Distribuição espacial do SBV entre 2011 e 2012 e do BTV-8 em 2006. Os dados mostrados são para os primeiros 121 dias de ambos os surtos. A inclusão mostra detalhes da área afetada por BTV-8. Mapa criado com o software ArcGISE® da ESRI.



Fonte: SEDDA; ROGERS (2013).

O SBV foi detectado pela primeira vez em novembro de 2011 em vacas que apresentavam febre e diarreia, criadas na região de Schmallingenberg, na Alemanha, perto da fronteira com a Holanda, sendo que as primeiras infecções agudas foram relatadas em agosto de 2011 e as primeiras malformações congênitas foram detectadas na Holanda em dezembro de 2011. O vírus se espalhou rapidamente pela Europa e sua presença foi relatada em 29 países europeus em menos de 2 anos (2011 a 2012) sendo que o SBV circulou em um nível muito baixo em 2013 (provavelmente devido ao estado imunológico dos animais susceptíveis) havendo um declínio na imunidade do rebanho (causada pela substituição de animais por animais jovens soronegativos, por exemplo) e, conseqüentemente, novamente relatos de surtos de malformações congênitas em 2015-2016 na Europa, porém em menor grau dos que aconteceram na emergência inicial em 2011 (VARELA et al., 2013; STAVROU et al., 2017).

A presença do SBV foi reportada na Bélgica no final de dezembro de 2011, no Reino Unido e nordeste da França em 22 de janeiro de 2012, 16 de fevereiro em Luxemburgo, 17 de fevereiro no nordeste da Itália e 12 de março na Espanha (DOCEUL et al., 2013).

Assim, o SBV provavelmente adentrou pelo noroeste da Europa na região fronteira da Holanda, Alemanha e Bélgica, se espalhando rapidamente pelos países vizinhos como Luxemburgo, França, Itália, Espanha, Dinamarca e Reino Unido. Nos anos seguintes, o vírus continuou se alastrando por todo continente europeu e para regiões não antes afetadas como também reapareceu repetidamente no centro da epidemia inicial (VARELA et al., 2013; WERNIKE et al., 2018).

Contínuas investigações de amostras de campo revelaram que SBV se espalhou pela Alemanha ao longo de um gradiente geográfico leste-oeste, bem como na Europa, a um ritmo impressionante, resultando em uma soroprevalência de até 100% em algumas regiões afetadas ampla disseminação por toda a Europa e alguns países asiáticos (SCHULZ et al., 2015).

Quando diagnosticado, a soroprevalência do SBV é alta. Um estudo realizado na Holanda e Bélgica em 2012 revelaram uma prevalência de 95,5% e 99,76%, respectivamente, em nível de fazenda (KAUFFOLD; VAHLENKAMP; HOOPSA, 2014).

A partir do final de 2011 após a primeira temporada vetorial, observou-se uma soroprevalência muito alta (entre 70 a 100%) em ruminantes domésticos no centro da epidemia (noroeste da Alemanha, Holanda e Bélgica). Na temporada vetorial seguinte, houve circulação do SBV, mas em um nível muito baixo e predominantemente na margem da área inicialmente mais afetada, onde os animais susceptíveis provavelmente permaneceram. Em 2013, os casos de detecção do genoma viral foram detectados de forma esporádica na Alemanha. No verão de 2014, o SBV reapareceu em maior medida, sendo que a razão disso ainda não foi completamente elucidada. Uma possível causa é a existência de hospedeiros reservatórios transitórios para o vírus (MOUCHANTAT et al., 2015; WERNIKE et al., 2015b).

Até 2013, cerca de 3000 estabelecimentos europeus foram infectados com SBV, sendo que Alemanha (1120 fazendas), França (1048 fazendas) e Holanda (981 fazendas) foram os países mais frequentemente afetados a partir de abril de 2012 e os rebanhos bovinos e ovinos foram mais afetados do que os caprinos (HERDER et al., 2012).

Até 2014, 27 países europeus notificaram a ocorrência de SBV, sendo que infecções agudas de ruminantes adultos e/ou descendentes com malformações SBV positivos foram detectados em mais de 5000 fazendas em toda a região afetada. Provavelmente este número seja subestimado, devido a casos novos de SBV não terem sido reportados por causa das restrições comerciais internacionais impostas aos países que relataram infecções por SBV, para evitar a introdução do vírus em áreas novas (WERNIKE et al., 2014).

No Reino Unido, após três anos de baixa circulação do SBV, houve uma reemergência em 2016/2017, sendo que em dezembro de 2016 foram confirmados casos de cordeiros

malformados positivos para o SBV, atingindo o pico em janeiro e fevereiro de 2017, ou seja, é provável que o SBV tenha circulado amplamente no Reino Unido em setembro/outubro de 2016, sendo que também foi detectado soroconversão para SBV em outubro de 2016. Essa recirculação do SBV foi comparável ao surgimento inicial 2011/2012 (STOKES et al., 2017; LARSKA, 2018).

Uma modelagem matemática analisou a propagação do SBV em toda a Europa, descobrindo uma alta competência vetorial e alta taxa de replicação para temperaturas comuns na Europa (16 a 34°C), sendo que o potencial de propagação é altamente sensível à temperatura. A medida que a temperatura aumenta, o potencial de propagação nos anos seguintes diminui, isso porque os animais ficam infectados e desenvolvem imunidade durante o primeiro ano permanecendo menos animais suscetíveis, o que explicaria a falta de casos na Europa nos anos subsequentes a épocas de temperatura mais altas (BESSELL et al., 2014; STAVROU et al., 2017).

Em uma modelagem do espalhamento em escala continental do SBV pela Europa demonstrou-se que a rota de transmissão mais importante é a dispersão vetorial (a qual é dependente da densidade) e rotas alternativas independentes da densidade, como por meio de equipamentos, pessoas e movimentos de animais e produtos de origem animal (como sêmen) são coadjuvantes nos mecanismos de propagação do SBV (GUBBINS et al., 2014).

No entanto, existem dois problemas principais que atrapalham a investigação da propagação em escala continental do SBV: dificuldade na obtenção dos dados de quando as regiões ou propriedades são infectadas e a subestimação dos casos, porque as manifestações clínicas são leves em bovinos adultos, inaparentes em ovinos adultos e por não se tratar de uma doença de notificação obrigatória em muitos países (GUBBINS et al., 2014).

Muitos estudos de soroprevalência, quadros clínicos e malformações congênitas demonstram a circulação do SBV na Europa como na Holanda (ELBERS et al., 2012b, 2012a), Áustria (STEINRIGL et al., 2014); Bélgica (GARIGLIANY et al., 2012b; MÉROC et al., 2015; DELOOZ et al., 2017) com recirculação em 2014 e 2015 (SOHIER et al., 2017), França (GACHE et al., 2013), Turquia (AZKUR et al., 2013), Suíça (BALMER et al., 2015; MALMSTEN et al., 2017), Suécia (WENSMAN et al., 2013; MALMSTEN et al., 2017), Polônia (LARSKA et al., 2014; KĘSIK-MALISZEWSKA et al., 2017), Espanha (FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2014), Reino Unido e República da Irlanda (KING et al., 2015) com recirculação em 2016 (COLLINS et al., 2017b), Portugal (ESTEVEES et al., 2016b), República Tcheca, Estônia, Eslovênia, Letônia, Hungria, Croácia (DOCEUL et al., 2013; BOUCHEMLA et al., 2018), Escócia (BRÜLISAUER et al., 2017) Grã Bretanha (MCGOWAN

et al., 2018), Sérvia (BOJKOVSKI et al., 2015), Itália (GOFFREDO et al., 2013), Grécia (CHAINTOUTIS et al., 2014), Dinamarca (RASMUSSEN et al., 2014), Luxemburgo, Finlândia (DOCEUL et al., 2013), Noruega (WISLØFF et al., 2014), Romênia (DANES et al., 2013), Suíça (BALMER et al., 2015) e também sua expansão para outros lugares além da Europa como Iran (RASEKH; SARANI; HASHEMI, 2018); China (ZHAI et al., 2017), Etiópia (ASMARE et al., 2018; SIBHAT et al., 2018), Tanzânia (MATHEW et al., 2015), Moçambique (BLOMSTRÖM et al., 2014), Rússia (BOUCHEMLA et al., 2018), Líbano (ABI-RIZK; KANAAN; HAGE, 2017), Namíbia (MOLINI et al., 2018) e Azerbaijão (ZEYNALOVA, 2019). Um estudo sorológico realizado na Costa Rica em bovinos, ovinos e caprinos não detectou a presença de animais reagentes para SBV (VILLEGAS-SALAS et al., 2017).

Entre 2011 e 2017, do total dos surtos mundiais de SBV, cerca de 63,22% ocorreram em países europeus sendo distribuídos da seguinte forma: França 61,89%, Alemanha 22,04%, Bélgica 7,01%, Holanda 4,25%, Grã-Bretanha 3,32%, Suíça 1,09%, Luxemburgo 0,21%, Itália 0,1%, Espanha 0,06% e Dinamarca 0,04%. De acordo com a estrutura de morbidade, o agente causador circulou principalmente em bovinos (64,76% dos casos) e entre pequenos ruminantes (33,68% dos casos sendo que 1,56% deles são caprinos) (BOUCHEMLA et al., 2018).

Até agora, o genoma do SBV e/ou anticorpos anti-SBV foram detectados em ruminantes predominantemente bovinos, ovinos e caprinos (LALOY et al., 2017a), mas também já foi reportado em bisontes (GARIGLIANY et al., 2012a), alces, alpacas, búfalos, veados, cervos, lhamas e javalis (DOCEUL et al., 2013; WERNIKE et al., 2014; SCHULZ; BEER; HOFFMANN, 2015; MALMSTEN et al., 2017).

Autoridades europeias ponderavam que cavalos não exerciam papel de reservatório na epidemiologia do SBV. No entanto, um estudo realizado no Irã em 2018 detectou a presença de anticorpos anti-SBV em cavalos. Porém, tal estudo deve ser interpretado com cautela, uma vez que os animais testados provinham de áreas endêmicas de outros vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu e como não foi realizado o teste de VN e nem detecção molecular do SBV, não foi possível excluir a possibilidade de reação cruzada com outros vírus do sorogrupo Simbu, como Aino (AINV) e Akabane (AKAV) (RASEKH; SARANI; HASHEMI, 2018).

Em cães, foram detectados anticorpos anti-SBV em um cão sem manifestações clínicas na Suécia em 2013 (WENSMAN et al., 2013) e na França em 2012 um único caso de um cão PCR positivo com torcicolo e encefalopatia degenerativa (SAILLEAU et al., 2013).

Também foi detectada a presença de anticorpos em vários animais de zoológico como *Giraffidae* e elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) (MOLENAAR et al., 2015).

Os hospedeiros confirmados apenas por sorologia incluem: cervídeos (MALMSTEN et al., 2017), veado-vermelho (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*), corça (*Capreolus capreolus*), camurça-dos-pirineus (*Rupicapra pyrenaica*), bisonte-europeu (*Bison bonasus*), camurça (*Rupicapra rupicapra*), alce (*Alces alces*), muflão-europeu (*Ovis aries musimon*), íbex (*Capra ibex*) (GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2017), dezoito espécies de ruminantes selvagens e exóticas mantidas em cativeiro na Holanda e França (LALOY et al., 2016), sendo que a soroprevalência em espécies silvestres atingiu cerca de 54,54% (média mundial) (BOUCHEMLA et al., 2018; RASEKH; SARANI; HASHEMI, 2018).

Na França, em 2012, foi realizado um estudo em filhotes de cães de 15 dias que apresentavam distúrbios neurológicos. Na sorologia (VN e ELISA) os filhotes não foram reagentes para SBV e a mãe apresentou título 128. No exame molecular, amostra de cerebelo dos filhotes foram positivas na RT-qPCR, sugerindo que esses cães foram infectados com SBV e que essa infecção ocorreu antes do início da competência imune fetal (SAILLEAU et al., 2013).

Na Suíça, em 2013, foi realizada uma investigação sorológica em 100 cães fêmeas, sem manifestações clínicas e residentes em áreas onde o SBV foi encontrado em ruminantes e dois animais apresentaram títulos de anticorpos contra SBV (WENSMAN et al., 2013).

Estudos como esses indicam que espécies não ruminantes podem ser infectados por SBV e induzir uma resposta imune podendo ser uma infecção transitória, recente ou subclínica ou não levar a quaisquer manifestações clínicas, o que pode ter impactos importantes sobre os padrões de transmissão e epidemiologia do SBV (SAILLEAU et al., 2013; WENSMAN et al., 2013).

Em um experimento de infecção *in vivo* em suínos inoculados subcutaneamente com SBV, demonstrou-se a ausência completa de viremia, além da ausência viral tanto em suabes nasal como nas fezes como também indução de uma soroconversão baixa e de curta duração, indicando que suínos são fracamente susceptíveis à infecção por SBV e não possuem um papel claro na epidemiologia do mesmo (POSKIN et al., 2014).

A infecção em carnívoros de vida livre e/ou pequenos mamíferos (roedores e musaranhos) e javali foi avaliada através de um estudo de soroprevalência entre 2011 e 2012 em animais da Renânia do Norte-Vestefália (Alemanha) e nenhum anticorpo contra o SBV foi detectado nos carnívoros e pequenos mamíferos, porém anticorpos contra SBV foram frequentemente detectados em javali (MOUCHANTAT et al., 2015).

Uma avaliação preliminar realizada pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) concluiu que, até agora, não há nenhuma evidência de que SBV acomete

seres humanos. Foram realizados estudos sorológicos e moleculares, para avaliar a transmissão zoonótica do SBV em veterinários e agricultores que foram expostos por contato direto e repetido com animais SBV-infectados, confirmados em laboratório, e com produtos de abortos e natimortos com altas cargas virais e também relato dos participantes terem sido picados por mosquitos e concluíram que o SBV não representa uma ameaça para a transmissão em seres humanos (DUCOMBLE et al., 2012; ELBERS et al., 2012b; REUSKEN et al., 2012; FLETA ZARAGOZANO, 2018).

3.3 CICLO REPLICATIVO

Pouco ainda se sabe sobre o ciclo de replicação do SBV. Assim, o conhecimento acumulado de outros bunyavírus pode ser inferido sobre o ciclo de replicação do SBV.

O ciclo de replicação dos bunyavírus ocorre exclusivamente no citoplasma da célula hospedeira. Inicia-se com o reconhecimento do receptor celular pelos heterodímeros Gn/Gc, presentes na superfície do vírus e, por endocitose, os vírions penetram na célula. Ocorrem mudanças no pH nas vesículas o que induz modificações conformacionais das glicoproteínas virais e exposição do peptídeo de fusão Gc. O envelope viral se funde com as membranas dos endossomos e ocorre a liberação no interior do citoplasma da ribonucleoproteína (RNP). (BOULOY et al., 1990).

A proteína L cliva da extremidade 5' do RNAm celular maduro uma sequência de 10 a 18 nucleotídeos para utilizá-la como iniciador para transcrição viral. O RNAm é sintetizado e traduzido por ribossomos das células hospedeiras, produzindo as proteínas virais, sendo que a L e N são necessárias para a replicação do genoma viral e Gn/Gc formam heterodímeros no retículo endoplasmático e são transportadas para o complexo de Golgi onde sua glicosilação é concluída. A polimerase L viral produz então, a partir de nucleotídeos livres, cópias complementares de todo o genoma viral (antigenomas) que também estão presentes como RNP, necessários para a produção de grandes quantidades de genomas virais. Esses se acumulam no complexo de Golgi, onde interagem diretamente com os domínios C-terminal das glicoproteínas Gn e Gc. A maturação das partículas virais ocorre por brotamento pela membrana modificada do aparelho de Golgi, sendo que para os orthobunyavírus, estas etapas dependem da proteína NSm associada ao aparelho de Golgi por três domínios transmembranares. Então, as partículas virais maduras são transportadas em vesículas para a membrana citoplasmática onde são liberadas por exocitose para o meio extracelular (DOCEUL et al., 2013).

3.4 TRANSMISSÃO

Exceto os Hantavírus, transmitidos por roedores, todos os bunyavírus são transmitidos por vetores artrópodes, como culicídeos flebotomídeos, culicídeos, thysanopteras e carrapatos (VARELA et al., 2013).

Estudos demonstraram que os vírus do sorogrupo Simbu são transmitidos por mosquitos do gênero *Culicoides*, *Aedes* e *Culex* e por várias espécies de carrapatos (DOCEUL et al., 2013).

A implicação de *Culicoides* spp. como vetores de AKAV, AINOV e SBV baseia-se principalmente no isolamento ou detecção genética do vírus em espécies desse gênero como também evidências epidemiológicas de que a faixa de distribuição e a sazonalidade dessas doenças coincidem com as dos mosquitos (DE REGGE, 2017).

Por meio de técnicas moleculares, a presença de SBV foi detectada em pool de mosquitos *Culicoides* sp, família *Ceratopogonidae* (complexo de *C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*, *C. punctatus*, *C. nubelosus*, *C. imicolai* e *C. pulicaris*) coletados durante época de reprodução do vetor em diversos países da Europa, sugerindo que a transmissão do SBV, assim como do BTV, ocorre principalmente através da picada de mosquitos *Culicoides* sp. Essa hipótese é ainda mais fortalecida pelo fato de que os pools analisados consistiam exclusivamente de cabeças dos mosquitos, ou seja, o vírus atingiu as glândulas salivares e não foi simplesmente positivo para SBV após uma refeição de sangue em animais virêmicos. Vale ressaltar que essas espécies também estavam envolvidas como vetores de BTV na Europa (BILK et al., 2012; RASMUSSEN et al., 2012; REGGE et al., 2012; GOFFREDO et al., 2013; PAWAIYA, R. V. S.GUPTA, 2013; KAMEKE et al., 2016).

A sazonalidade da distribuição de *Culicoides* sp depende fortemente das condições climáticas, sendo que a temperatura e a precipitação são os fatores mais determinantes. Em regiões tropicais, os vetores são conhecidos por estarem presentes o ano todo, enquanto que em regiões de clima temperado, o número de *Culicoides* sp adultos diminui fortemente ou mesmo desaparece virtualmente durante os meses de inverno. No entanto, a recuperação de ovelhas virêmicas na Alemanha no inverno e aumento da soroprevalência na Bélgica entre fevereiro e abril de 2012 evidenciam que o SBV persiste durante estadias de invernagem, mas há poucos estudos que expliquem a invernagem do SBV. Essas diferenças na sazonalidade de *Culicoides* spp. influenciam fortemente a epidemiologia da doença causada pelos vírus Simbu em diferentes regiões, incluindo o SBV (BILK et al., 2012; RASMUSSEN et al., 2012; REGGE et al., 2012; GOFFREDO et al., 2013; PAWAIYA, R. V. S.GUPTA, 2013; KAMEKE et al., 2016).

Para BTV, há quatro possíveis estratégias de hibernação, as quais podem ser extrapoladas para SBV: o vírus sobrevive em mosquitos adultos, que resistem ao inverno (mosquitos adultos são capazes de hibernar dentro de estábulos); ocorrência de transmissão transovariana do mosquito aos seus ovos durante a qual larvas e pupas podem sobreviver no inverno em criadouros protegidos; persistência do vírus em hospedeiros ruminantes e selvagens; transmissão transplacentária e persistência do vírus no feto até o nascimento. Outra hipótese é a ocorrência de reintroduções anuais do vírus pela disseminação de mosquitos infectados pelo vento ou pelo movimento de hospedeiros infectados de zonas endêmicas para regiões com animais ingênuos (POSKIN et al., 2016; DE REGGE, 2017).

O SBV infeccioso também persiste até o momento do nascimento na placenta (cotilédones e membranas fetais) de ovelhas inoculadas em laboratório com soro infeccioso para SBV nos dias 45 e 60 de gestação, geneticamente estável e passível de neutralização por anticorpos das ovelhas. Essa persistência do SBV por pelo menos 100 dias em ovelhas prenhas é outro aspecto da patogênese que poderia explicar a hibernação do SBV (POSKIN et al., 2017).

Como dito anteriormente, a temperatura é um fator que afeta as doenças infecciosas, principalmente as transmitidas por vetor. No entanto, é importante levar em conta que a conclusão do desenvolvimento do vírus (potencial de transmissão de doenças transmitidas por vetores) é determinada pelas temperaturas dos habitats microclimáticos em que os vetores se encontram. Estudos focados na caracterização das temperaturas microclimáticas em que os insetos vetores se encontram, em nível de fazenda, permitem a seleção de temperaturas apropriadas para modelar a transmissão de doenças transmitidas por esses, pois fornecem estimativas melhores de parâmetros de transmissão de doenças do que as temperaturas meteorológicas padrão, porque representam as temperaturas reais as quais os vetores são expostos. Isso pode variar substancialmente entre regiões, mesmo dentro de pequenas áreas (HAIDER et al., 2018).

Fatores que afetam a densidade e distribuição de vetores podem ajudar a determinar a prevalência de SBV em áreas específicas, por exemplo, a altitude pode ser um fator limitante para a transmissão do SBV. No entanto, o SBV foi diagnosticado em prados alpinos (a mais de 2000 metros de altitude) da Espanha e em ovinos confinados a uma região restrita, de temperaturas mais baixas e grande altitude (2000 metros acima do nível do mar) em Portugal (FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2014; FERREIRA et al., 2018).

O SBV não foi detectado em mosquitos *Culex pipiens*, portanto o mesmo parece não ter competência vetorial para transmissão do SBV, em condições de laboratório (DE REGGE, 2017).

Não foi detectada nenhuma evidência da presença e replicação do SBV em *Anopheles*, *Culiseta* e *Aedes* e portanto eles parecem não desempenhar um papel importante na epidemiologia e transmissão do SBV (WERNIKE; ELBERS; BEER, 2015).

O SBV também pode ser transmitido verticalmente, através da placenta de mães prenhes infectadas, via de transmissão particularmente importante, uma vez que o SBV está associado à malformação congênita e natimortos (PAWAIYA, R. V. S.GUPTA, 2013).

O RNA do SBV foi detectado (de forma intermitente) no sêmen de touros naturalmente infectados e a infecção por SBV foi relatada em bezerros inoculados experimentalmente com sêmen SBV RT-qPCR positivo, demonstrando que o sêmen de touros naturalmente infectados com SBV pode ser infeccioso e, portanto, a exportação de sêmen de países onde o SBV está presente, pode representar um risco de contaminação. No entanto, a possibilidade de transmissão venérea ainda não foi totalmente esclarecida (HOFFMANN; SCHULZ; BEER, 2013; COLLINS et al., 2019).

A transmissão por contato direto de animal com animal ou via oral é muito pouco provável. Em um estudo experimental com animais infectados por SBV via oral e subcutânea, o RNA viral foi detectado em amostras de soro e sangue durante vários dias nos animais infectados subcutaneamente, enquanto que os animais infectados via oral permaneceram negativos durante todo o estudo. Inoculando-se experimentalmente ovelhas por via intrasal, intradermal e subcutânea, somente as duas últimas reproduziram resultados semelhantes aos encontrados em condições de campo (WERNIKE et al., 2013a; MARTINELLE et al., 2017).

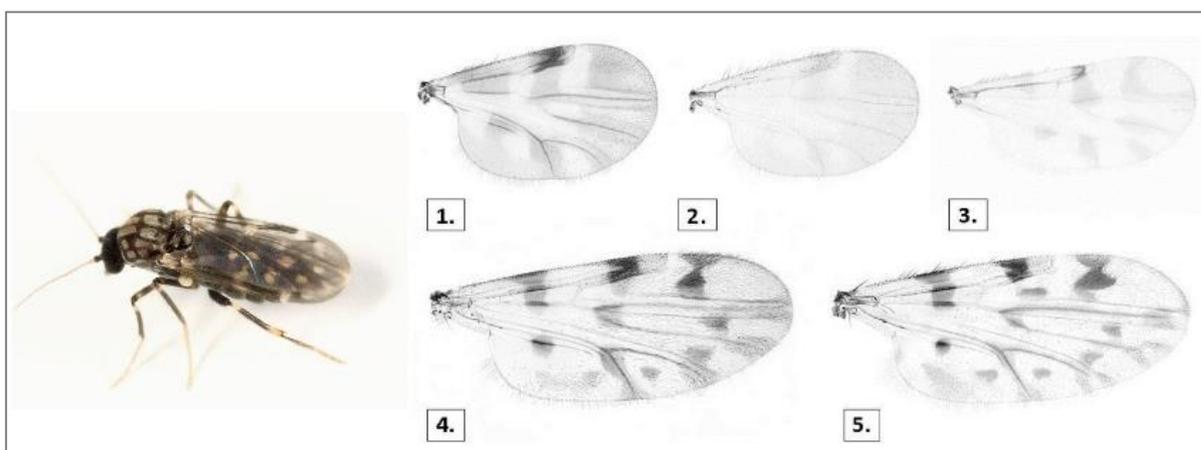
3.4.1 Gênero *Culicoides* Latreille (Diptera; Ceratopogonidae)

A família *Ceratopogonidae* compreende um grupo de insetos com mais de 5978 espécies descritas no mundo. Dentre os gêneros catalogados, o *Culicoides* Latreille, 1809, é um gênero cosmopolita, presente de áreas temperadas até os trópicos (ausente apenas na Antártica e Nova Zelândia), que contém cerca de 1355 espécies descritas em aproximadamente 34 subgêneros, alguns dos quais podem transmitir vírus patogênicos e nematoides filariais para seres humanos e outros vertebrados (BORKENT, 2015; YILDIRIM et al., 2019).

Representa um dos menores mosquitos hematófagos, medindo 1 a 3 mm, com aparelhos bucais (probóscide) bem adaptados para cortar a pele e sugar o sangue. São identificados a nível

de espécie com base na mácula da asa (figura 3). No entanto, tal método é demorado e depende da experiência profissional do examinador. Um método alternativo de identificação é a amplificação do genoma por PCR e subsequente sequenciamento genético e comparação filogenética das regiões marcadoras de DNA (SICK et al., 2019).

Figura 3: *Culicoides* sp e padrões das asas de espécies presentes na Irlanda e no Reino Unido. (1) *C. obsoletus*/*C. scoticus*, (2) *C. chiopterus*, (3) *C. dewulfi*, (4) *C. pulicaris*, (5) *C. punctatus*. Imagens cedidas pelo Instituto Pirbright.



Fonte: COLLINS et al., 2019.

O ciclo de vida compreende estágio do ovo, quatro fases larvares, uma pupa e imago. Os estágios larvais são dependentes de uma certa quantidade de água ou umidade. Os criadouros variam de poças, riachos, buracos de árvores, solo saturados, esterco de animais, pântanos, trincheiras, água estagnada e vegetação em decomposição. As fêmeas dependem de sague para a maturação dos ovos (oogênese) e se alimentam de sague de mamíferos e/ou aves. Os machos se alimentam apenas de néctar. O desenvolvimento leva de algumas semanas ou até meses (durante o inverno em um estágio larval) o que é dependente da temperatura. Em regiões de clima temperado, há um padrão de atividade sazonal, sendo que o número de insetos começa a aumentar no final da primavera e início do verão e atingem o pico no final do verão ou início do outono. Com o início de temperaturas baixas, o número de *Culicoides* cai drasticamente. A vida dos mosquitos adultos é breve, alguns duram até 10 a 20 dias e, durante esse tempo, a fêmea pode se alimentar do hospedeiro por mais de uma vez (SICK et al., 2019).

A distribuição geográfica e a abundância das espécies de *Culicoides* dependem da disponibilidade de hospedagens adequadas regulados por condições climáticas como temperatura, umidade e precipitação, o que interfere diretamente na capacidade de serem ativos e transmitirem patógenos, sendo que para a maioria das espécies o pico da atividade de voo

acontece no anoitecer e/ou amanhecer, o que pode alterar para um padrão diurno no frio ou noturno em climas quentes (VENTER; BOIKANYO; BEER, 2019).

Na Europa são descritas cerca de 120 espécies, dentre as quais as mais abundantes na Europa não mediterrânea são *C. obsoletus* e *C. scoticus*, agrupadas no complexo *Obsoletus*, o qual domina as coleções de *Culicoides* sp nas fazendas europeias e são menos abundantes ou ausentes nas altas latitudes escandinavas, regiões mediterrâneas e grandes altitudes. *C. dewulfi* e *C. chiopterus* (também do complexo *Obsoletus*) são abundantes ao longo do Canal da Mancha e no Mar do Norte na França, Inglaterra e Holanda e raras ou ausentes no sul da Europa. *C. impunctatus* e *C. newsteadi* são abundantes no norte da Europa (Escócia) e na região do Mediterrâneo (EFSA, 2014).

No noroeste da Europa, geralmente as espécies de *Culicoides* presente em fazendas e estábulos pertencem ao subgênero *Avaritia* (grupo *Obsoletus*) e foram implicados na transmissão do SBV, sendo que o vírus foi detectado em pools de cabeças de *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* na Holanda e *C. dewulfi* na Bélgica. No Reino Unido, até o momento, não foram identificadas essas espécies críticas, apesar do SBV circular em grande extensão do território e pelo mesmo período que circulou no noroeste da Europa (BARBER et al., 2018).

Em um estudo da fenologia e dinâmica de *Culicoides* sp em diversos ecossistemas da Holanda demonstrou a presença de 15 espécies de *Culicoides* nos quatro habitats de todo o país (pantanal, turfa, várzea e fazenda de gado) sendo que *C. obsoletus* (grupo dominante entre os *Culicoides* sp encontrados) e *C. pulicaris* estavam associados tanto a fazendas de gado como vetor na epidemia de BTV em 2006 na Europa e, comprovadamente, vetores de BTV e SBV (TAKKEN et al., 2008).

A criação de *C. dewulfi* tem sido associada ao esterco de animais em torno de estábulos e de cochos, mas pouco se sabe sobre a reprodução e habitats dos outros membros do gênero (TAKKEN et al., 2008).

Na Itália, as populações coletadas em campo de *C. imicola* não foram intimamente implicadas na transmissão do SBV (GOFFREDO et al., 2013).

Na França, houve detecção positiva de SBV em pools de *Culicoides* cinco meses antes do surgimento dos primeiros casos de natimortos e malformações congênitas, sendo que, apesar de uma grande diversidade de espécies tenham sido testadas, apenas nove foram positivas para SBV (*C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, *C. pulicaris*, *C. newsteadi*, *C. pulicaris*, *C. imicola* e *C. nubeculosus*), mesmas espécies envolvidas na transmissão de BTV na Europa (POSKIN et al., 2016; PAGÈS et al., 2018).

Mosquitos pertencentes ao grupo *Obsoletus* foram encontrados também em latitudes mais ao norte, como 65 ° N, e são provavelmente responsáveis pela transmissão do SBV também na Suécia. No entanto, nessas áreas a maioria dos mosquitos capturados pertencia ao grupo *Pulicaris*, sendo que o papel dessas espécies como vetores para SBV não pode ser excluído, mas, até agora, ainda é desconhecido (CHENAIS et al., 2015).

No Brasil, conhecido popularmente como mosquito-pólvora, são conhecidas pelo menos 116 espécies de *Culicoides* spp. das quais aproximadamente 70% ocorrem na região amazônica brasileira (FARIAS et al., 2016). Nas demais regiões, ainda são poucos os levantamentos entomológicos voltados para o conhecimento da diversidade desse gênero, mas já é sabida a ocorrência nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro de pelo menos 25 espécies. São encontrados desde o nível do mar até 4000 metros de altitude, alimentando-se do sangue de mamíferos e aves (COSTA et al., 2013).

A fauna de *Culicoides* spp. da região amazônica inclui aproximadamente 89 espécies conhecidas que pertencem a sete subgêneros, 10 grupos de espécies informais e uma espécie não agrupada, sendo que um levantamento realizado em 2016 das espécies presentes no Amazonas identificou-se a espécie *Culicoides pusilloides*, pertencente ao mesmo subgênero (*Avaritia*) do *C. obsoletus* conhecido como vetor competente do SBV na Europa (FARIAS; ALMEIDA; PESSOA, 2016).

Os *Culicoides* sp adquirem o vírus durante a hematofagia, necessária para a maturação de seus ovos, em um hospedeiro vertebrado em viremia. A replicação inicial do vírus ocorre no epitélio intestinal médio. Posteriormente, o vírus se dissemina para o hemocelo, permitindo o transporte na hemolinfa. O vírus penetra então nas células das glândulas salivares, replica-se e atinge os dutos da saliva, onde ele fica disponível para infectar o hospedeiro durante hematofagia subsequente da mordida. A evidência da presença de SBV na cabeça dos mosquitos (por baixo valores de Cq na pesquisa molecular) indica uma disseminação completa do vírus no mosquito (DE REGGE, 2017; PAGÈS et al., 2018; TIWARI et al., 2018).

O RNA do SBV já foi detectado em fêmeas *Culicoides* sp nulíparas, assim como em machos, o que sugere a transmissão transovariana do vírus ou RNA viral (KESIK-MALISZEWSKA et al., 2019)

Embora o alcance de voo dos *Culicoides* sp não exceda algumas centenas de metros, eles podem ser dispersos passivamente e por grandes distâncias pelo vento. O estabelecimento de colônias de laboratório apresenta grandes dificuldades, porque os mosquitos coletados em campo não conseguem se reproduzir em condições de laboratório, o que dificulta os estudos de competência vetorial. A maioria das colônias de laboratório são compostas por *C. nubeculosus*

e *C. sonorensis*, sendo que a maior parte dos dados disponíveis sobre infecção experimental pertence a essas duas espécies (SICK et al., 2019).

3.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas causadas pela infecção por SBV geralmente são inaparentes em ruminantes adultos e não prenhes, enquanto que a infecção fetal pode levar a malformações tanto no sistema nervoso central (SNC) como músculo esquelético. Os vírus do sorogrupo Simbu são neurotrópicos em fetos (HERDER et al., 2012).

A infecção de animais adultos causa nenhuma ou apenas manifestações clínicas transitórias e não específicas. Observa-se perda da condição corporal, diminuição na produção de leite (até 50%), diarreia e febre (que dura aproximadamente 2 a 3 semanas), sendo que o período de viremia é curto (em torno de 2 a 6 dias em bovinos), com recuperação total em 2 a 3 semanas (GARIGLIANY et al., 2012a; PAWAIYA, 2013, LIEVAART-PETERSON et al., 2015).

Em infecções de campo ou experimentais, manifestações clínicas exibidas por ovelhas adultas são mais brandas ou ausentes do que as exibidas por bovinos e nenhuma foi observada em cabras ou alpacas (LIEVAART-PETERSON et al., 2015; STAVROU et al., 2017).

Nas fêmeas ruminantes prenhes que são infectadas durante um período crítico de gravidez, principalmente em animais ingênuos infectados pela primeira vez durante o período vulnerável da gestação, o vírus atravessa a placenta (transmissão vertical) e se reproduz no feto, produzindo abortos e malformações congênitas (BILK et al., 2012). Assim, as fêmeas infectadas são capazes de transmitir o vírus aos fetos (ovinos, caprinos e bovinos) que desenvolvem malformações que levam a morte intra-uterina ou natimorto. Portanto o SBV é um agente teratogênico. A infecção em animais prenhes também tem sido associada a menores taxas de concepção e redução nas taxas de desmame (DOCEUL et al., 2013).

A detecção do genoma do SBV já foi relatada em natimortos e fetos abortados ou recém-nascidos bovinos, ovinos e caprinos. São afetados tanto o sexo masculino e feminino. Baseado em estudos de campo, o impacto das infecções por SBV aparentemente é maior em ovelhas do que em bovinos, mas não se sabe qual a porcentagem de animais que o vírus atravessa a barreira placentária e se o feto se infectar, qual a frequência em que aborto e natimorto são realmente induzidos, além do que ainda não está claro o período crítico de gravidez durante o qual o SBV causa malformação ou aborto (KÖNIG et al., 2018).

As malformações congênitas e clínicas incluem distúrbios neurais e músculos esqueléticos (Síndrome da Artrogripose-Hidranencefalia) como braquialgia inferior, curvatura da coluna vertebral (cifose, lordose ou escoliose), artrogripose, anquilose, torcicolo e hidranencefalia. Animais nascidos vivos apresentam fraquezas, dificuldade em mamar e ficar de pé; alguns outros apresentaram cegueira ou dificuldades de visão o que os faz colidir com objetos em seu ambiente, dificuldade de orientação e baixa ou nenhuma resposta ao serem ameaçados. Além disso, existem sinais neurológicos que incluem: ataxia, tetania, paresia, movimentos de pedalagem e caminhada em círculo, que são observados individualmente ou em combinação (BILK et al., 2012; HERDER et al., 2012).

3.6 PATOGENESE

Até o momento, características patogênicas do SBV não são bem compreendidas e são diferentes para invertebrados e vertebrados, sendo que a infecção de células de mamíferos é citolítica resultado em morte celular e a infecção de células de insetos leva a persistência (TIWARI et al., 2018).

Os pressupostos da patogênese em ruminantes são frequentemente baseados em achados descritos para o vírus Akabane (ESTEVEZ et al., 2016a).

Estudo realizado por Bilk e colaboradores em 2012 analisou a distribuição por órgãos do SBV em cordeiros e bezerras malformados. Pela técnica de RT-qPCR analisaram a presença de SBV no baço, SNC, mecônio, medula espinhal, cartilagem de costela, cordão umbilical, fluido placentário do estômago e fluido placentário externo raspado do casaco dos fetos. Os resultados do estudo sugerem que cérebro, coluna vertebral, fluido placentário externo e cordão umbilical são os órgãos mais adequados para detecção de SBV (maiores títulos virais) e grandes quantidades de SBV são dispersos no ambiente durante o nascimento de cordeiros malformados (BILK et al., 2012).

A infecção experimental em bovinos e ovinos mostrou que o período de incubação do SBV é de 1 a 4 dias, com período de viremia de 1 a 5 dias e dentro de 2 a 3 semanas após a infecção, anticorpos neutralizantes puderam ser detectados e persistiram em bovinos por pelo menos dois a três anos. A imunidade contra o SBV é passada para a progênie pelo colostro e permaneceram por aproximadamente 5 a 6 meses em bovinos e cerca de 4 meses em ovinos (BILK et al., 2012; DE REGGE, 2017; CLAINE et al., 2018).

A infecção natural demonstrou induzir anticorpos persistentes em vacas infectadas com duração de pelo menos 36 meses em bovinos e 48 meses em ovinos (STAVROU et al., 2017; CLAINE et al., 2018).

Anticorpos adquiridos após infecção natural por SBV foram detectáveis em mais de 75% dos bovinos mantidos em ambientes fechados e monitorados durante um período de 6 anos, assim apresentavam uma imunidade humoral específica provavelmente adquirida durante a primeira infecção (2011 ou 2012), indicando que anticorpos anti-SBV persistiram na maioria dos bovinos por pelo menos seis anos, ou até mesmo pelo resto da vida (WERNIKE et al., 2018).

Em um estudo realizado por Varela e colaboradores (2013) estabeleceu-se uma plataforma experimental com sistemas *in vivo* e *in vitro* para estudar a biologia e patogênese do SBV, o que permitiu definir que os neurônios no cérebro parecem ser o principal sítio para a replicação viral no feto em desenvolvimento. Fetos de ovelhas parecem ser susceptíveis à infecção por SBV de 28 a 50 dias de gestação, o que coincide com o desenvolvimento da barreira hematoencefálica (VARELA et al., 2013).

As malformações observadas em infecções por SBV em cordeiros e bezerros são acompanhadas de hipoplasia muscular e desmielinização. Também, o SBV infecta neurônios da matéria cinzenta da medula espinhal, o que sugere que a hipoplasia muscular são principalmente secundários ao dano do SNC (VARELA et al., 2013).

Pouco se sabe sobre os fatores virais envolvidos na patogenicidade do SBV. No entanto, foi demonstrado que camundongos *Knock-out* do receptor IFN-I (IFNAR) são susceptíveis a infecção por SBV e desenvolvem doença fatal e a injeção intracerebral de SBV é letal para os camundongos NIH-Swiss. Também, um estudo sugeriu que soro de bovino infectado é mais adequado para modelo de infecção SBV do que vírus de cultivo celular e NSs são capazes de modular a resposta imune inata do hospedeiro por inibição da produção de IFN pela célula hospedeira ao nível da transcrição, especialmente pela proteína NSs, que atua como um fator de virulência que antagoniza o interferon, provavelmente pela inibição global do metabolismo das células hospedeiras. Assim, a resposta imune inata do hospedeiro é superada e a replicação viral eficiente é permitida (DOCEUL et al., 2013; PAWAIYA, R. V. S.GUPTA, 2013).

Estudos demonstraram que o SBV é patogênico (defeitos teratogênico) em modelo de ovos embrionados de galinha (OEG), pois embriões de galinhas infectados com SBV apresentaram anormalidades congênitas consistentes com a doença relatada em ruminantes como mortes, atraso no crescimento e malformações musculoesqueléticas (COLLINS; MEE; KIRKLAND, 2018).

Apesar do SBV não ser transmitido via oral, o RNA foi detectado em esfregaços fecais, orais e nasais de animais infectados subcutâneamente. O SBV não se replica em leucócitos bovinos, mas influencia seu equilíbrio no sangue, sendo que o RNA viral permanece no sistema linforeticular durante pelo menos 5 semanas após a infecção (WERNIKE et al., 2013a).

A infecção pelo SBV durante o período gestacional, o desenvolvimento de defeitos teratogênicos e sua gravidade estão diretamente associados com o tempo gestacional no momento da infecção, desenvolvimento do sistema imunológico fetal (que em bovinos ocorre entre os dias 40 e 175 de gestação e ovino entre os dias 19 e 115 de gestação) e vulnerabilidade do SNC fetal (bem definido em bovinos entre os dias 60 e 180 de gestação) (ESTEVEES et al., 2016b).

Se a infecção materna ocorrer no período gestacional precoce, antes do feto se tornar imuno-competente (entre os dias 90 e 180 de gestação em bovinos, entre os dias 25 e 50 em ovinos) lesões severas e características são descritas, sem evidências de inflamação. Se a infecção materna ocorrer no período gestacional tardio (após o 180º dia de gestação em bovinos e após o 50º dia em ovinos), a inflamação - polioencefalomielite não-supurativa (linfocítica) ou meningoencefalomielite - pode estar presente devido ao reconhecimento do antígeno viral pelo sistema imunológico fetal (ESTEVEES et al., 2016b).

Em caprinos, a transmissão vertical do SBV pode ocorrer entre os dias 28 e 42 da gestação e é amplamente difundido em fetos infectados podendo levar a morte embrionária ou fetal e lesões no SNC em animais nascidos vivos (LALOY et al., 2017b).

3.7 ACHADOS DE NECROPSIA

Não são observadas lesões específicas nas cavidades torácica e abdominal. As principais lesões estão no SNC que exhibe, quase de forma sistemática, deformidades morfológicas severas como hidranencefalia, hipoplasia da medula espinhal e cerebelar (GARIGLIANY et al., 2012a).

Alterações musculoesqueléticas em abortos e natimortos são muito comuns, como deformidades no maxilar, das vértebras ou membros apresentando-se como braquignatia inferior, mandíbula inferior malformada, torcicolo, escoliose, cifose, artrogripose e lordose. As deformidades vertebrais são frequentemente associadas à atrofia unilateral do músculo da coluna vertebral. As articulações aparecem bloqueadas pela contração músculo-tendão e atrofia muscular são comuns (GARIGLIANY et al., 2012a).

As malformações predominantes no SNC de cordeiros e bezerros são hidranencefalia, porencefalia (cavidades preenchidas com líquido cístico no tecido cerebral, que se comunicam

com o sistema ventricular e geralmente são descritas como a cavitação dos hemisférios cerebrais), hidrocefalia (caracterizada pela destruição dos hemisférios do cérebro, muitas vezes com uma substituição completa ou quase completa do córtex pelo líquido cefalorraquidiano, cercada por um saco membranoso fino, quase transparente), microencefalia, hipoplasia cerebelar e displasia leve a moderada do cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (caracterizada por perda neuronal nos chifres ventrais e, aparentemente, está correlacionada positivamente com a magnitude das deformidades musculoesqueléticas) e lissencefalia (falta de giros do cérebro) (PEPERKAMP et al., 2015; ESTEVES et al., 2016a).

3.8 ACHADOS HISTOLÓGICOS

Histologicamente, as malformações descritas causadas pelo SBV podem ser acompanhadas da presença ou não de inflamações, como encefalomielite, meningoencefalomielite linfocítica e nódulos gliais. Microscopicamente observa-se rarefação e cavitação, degeneração, necrose, perda de neurônios, leve a grave astrogliose difusa e/ou microgliose (PEPERKAMP et al., 2015; ESTEVES et al., 2016a).

Nos músculos esqueléticos observa-se hipoplasia do tecido muscular estriado (redução severa do diâmetro muscular), hipoplasia miofibrilar, atrofia e perda de massa muscular esquelética principalmente nos membros e pescoço. Em outros órgãos analisados como bexiga urinária, glândula tireóidea, fígado, baço, músculo cardíaco e vasos, útero, ovários, testículos, nervos periféricos, placenta, esôfago, abomaso, intestino grosso, pâncreas, glândulas adrenais, gânglios celíacos, traqueia, pele, língua e tecido adiposo não foram observadas lesões histopatológicas significativas (PEPERKAMP et al., 2015; ESTEVES et al., 2016a).

Estudos histológicos revelaram que ovinos infectados com SBV apresentavam inflamação linfo-histiocítica no SNC e nódulos gliais no mesencéfalo e hipocampo. Em bezerros e cordeiros foram detectados astrogliose e microglifose e alguns casos de hipoplasia miofibrilar de músculos esqueléticos, além de meningoencefalite e poliomielite (DOCEUL et al., 2013).

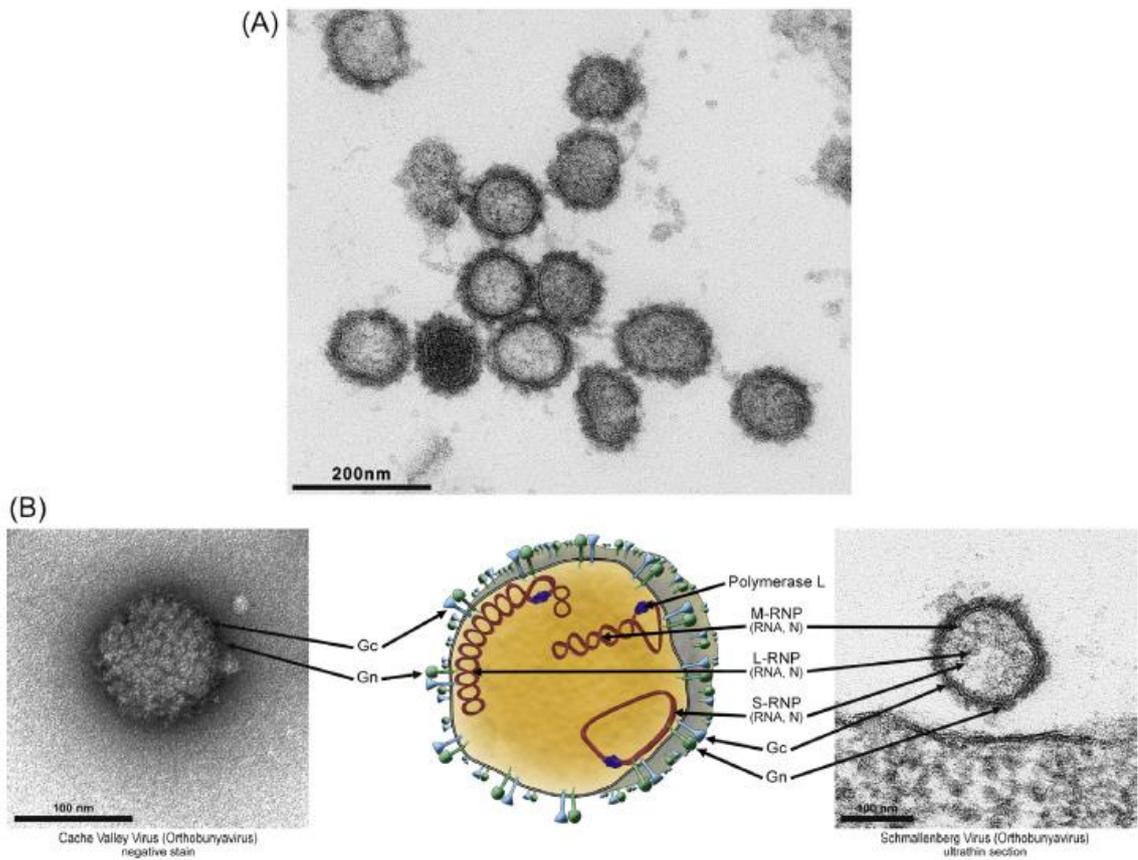
O principal sítio de replicação do SBV são os neurônios, sendo que a gravidade da lesão fetal é dependente do período gestacional em que houve a infecção, sendo que o dano máximo ocorre quando os tecidos neurais estão sendo diferenciados. Nenhum sinal clínico visível está presente se ocorrer infecção *in utero* quando o sistema imunológico do feto é capaz de controlar a infecção (DOCEUL et al., 2013).

Estudo realizado com 40 ovelhas, 2 cabras e 16 bovinos naturalmente infectados com SBV descreveu que as lesões histológicas mais comuns observadas incluíram meningoencefalomielite linfo-histiocítica em alguns casos, nódulos gliais principalmente no mesenóide alo e hipocampo, degeneração e necrose neurais, principalmente no tronco encefálico, micromielia com perda da matéria cinza e branca e os músculos esqueléticos apresentavam hipoplasia miofibrilar em cordeiros e bezerros (HERDER et al., 2012).

3.9 ESTRUTURA, ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS

Os Orthobunyavirus (figura 4) são caracterizados por um genoma de RNA tripartido e de cadeia simples sentido negativo. Cada segmento é denominado de acordo com seu tamanho: pequeno (*S- small*), médio (*M-medium*) e grande (*L- low*). Esses segmentos codificam quatro proteínas estruturais, sendo elas: nucleocapsídeo (N), duas glicoproteínas de envelope transmembranares integrantes de tipo I modificadas por glicosilação ligadas a N (Gn e Gc) e a polimerase viral. Também codificam duas proteínas não estruturais: NSs e NSm (VARELA et al., 2013).

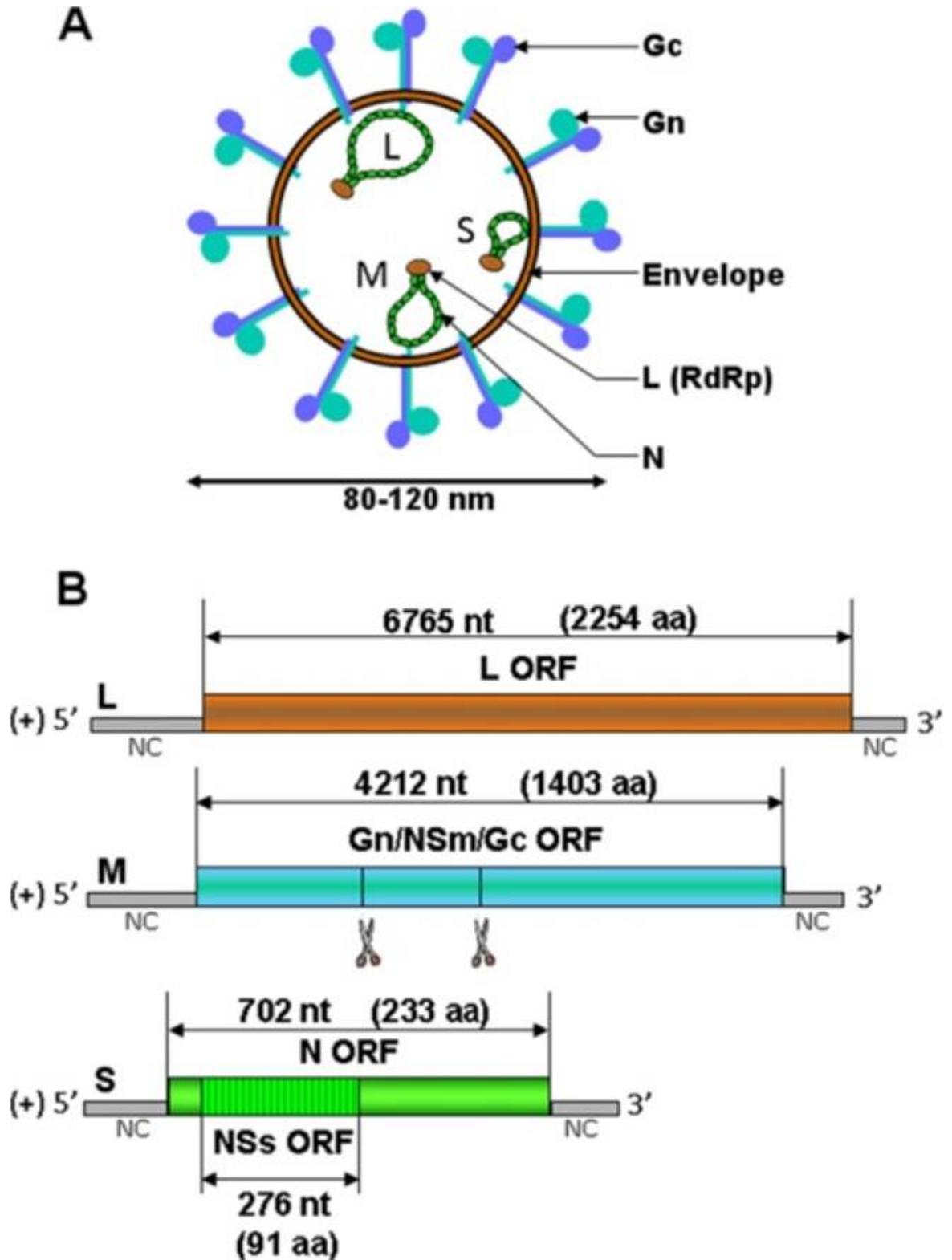
Figura 4: Morfologia de vírions do vírus Schmallenberg em seção ultrafina (A), morfologia e organização do genoma de bunyavírus (B).



Fonte: WERNIKE et al. (2014).

O segmento L (6865 nucleotídeos) codifica a RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) L ou proteína L. O segmento M (4415 nucleotídeos) codifica um precursor de poliproteína que é clivado pós-tradução em duas glicoproteínas de superfície Gn e Gc, e a proteína não estrutural NSm. O segmento S (830 nucleotídeos) codifica duas proteínas de ORF sobrepostas: a proteína do nucleocapsídeo N e a proteína não estrutural NSs (figura 5) (DOCEUL et al., 2013; FISCHER et al., 2013a; PAWAIYA, R. V. S.GUPTA, 2013; WERNIKE et al., 2014, 2015b).

Figura 5: Esquema partícula bunyavírus (A) e dos três segmentos de RNA (S, M e L) do SBV(B).



Fonte: DOCEUL et al. (2013).

A proteína NSs (massa molecular de aproximadamente 12 kDa) é um importante fator de virulência. Ela inibe o RNAm das células hospedeiras e síntese proteína promovendo seu

desligamento. Está envolvida na regulação da tradução, apoptose e atividade da polimerase viral em ambos hospedeiros mamíferos e insetos. Promove a degradação da Rpb1 (subunidade do complexo RNA polimerase II) dificultando o processo da transcrição celular, contém a localização nucleolar (NoLS) e induz a desorganização do nucléolo o que impede a resposta antiviral celular e/ou induz a morte celular. Também bloqueia a produção de interferon (IFN) pela inibição da transcrição e respostas inatas do hospedeiro contribuindo para a patogênese viral. Não é essencial para a replicação viral e não é necessária para crescimento do SBV em cultivo celular de mamífero ou insetos. Experimentos com mutantes de deleção de NSs não indicaram replicação viral ou doença clínica em bovinos (BLOMSTRÖM et al., 2015; GOUZIL et al., 2017; KEŚIK-MALISZEWSKA et al., 2018; KRAATZ et al., 2018a).

A proteína NSm (massa molecular de aproximadamente 16-18kDa) desempenha papel na fixação do complemento como também modula a resposta imune inata de células hospedeiras, atuando como antagonista de interferon em células de mamíferos e também parece desempenhar um papel no processo de replicação em mosquitos. Participa do fechamento da síntese proteica, montagem viral, morfogênese e brotamento. Mutantes sem NSm se replicam em cultura de células, mas tem sua virulência reduzida em camundongos, tanto na viremia como na soroconversão. É constituída por três domínios hidrofóbicos (I, III, V) e dois não hidrofóbicos (II, IV) e co-localiza-se com a glicoproteína Gc e complexo de Golgi em células infectadas. Mutantes com deleção dos domínios I e V não são viáveis e o mutantes com deleção do domínio III se replicam em cultura de células em um nível mais baixo, mas sem alterar a patogenicidade em camundongos. Os domínios I e V são essenciais para a clivagem da proteína precursora e maturação da glicoproteína e o domínio IV é essencial para a localização/retenção de NSm tanto no complexo de Golgi como na co-localização com Gc (KEŚIK-MALISZEWSKA et al., 2018; KRAATZ et al., 2018b).

As partículas de Orthobunyavirus são constituídas por 4 proteínas estruturais, sendo duas glicoproteínas de superfície Gn e Gc, o complexo viral de polimerase composto da proteína da polimerase L (massa molecular de aproximadamente 261 kDa) e da nucleoproteína N, responsável pela transcrição e replicação dos vírus que ocorrem exclusivamente no citoplasma. No interior da partícula viral, o genoma está presente como uma ribonucleoproteína (RNP) associada a muitas cópias de nucleoproteína N e algumas cópias da polimerase L (DOCEUL et al., 2013).

A proteína N (massa molecular de aproximadamente 25 kDa) oligomeriza-se como um tetrâmero e é essencial para a encapsulação do genoma viral como também está envolvida na

transcrição e replicação do RNA viral e é a proteína mais conservada entre os *Orthobunyavirus* e provoca forte resposta imune humoral (WERNIKE et al., 2015a).

As proteínas Gn (massa molecular de aproximadamente 35 kDa) e Gc (massa molecular de aproximadamente 110 kDa) são proteínas transmembranares integral glicosiladas ligadas a N, ricas em resíduos de cisteína que formam um hetero-dímero no retículo endoplasmático das células infectadas, formam picos na partícula do vírus e são importantes tanto na união viral quanto na fusão da membrana celular. Atuam como determinantes antigênicos e são reconhecidas por anticorpos neutralizantes. O domínio N terminal da proteína Gc codifica o ectodomínio exposto no envelope viral e não é essencial para a replicação viral em cultura de tecido e o domínio C terminal codifica o peptídeo de fusão (WERNIKE et al., 2015a; KĘSIK-MALISZEWSKA et al., 2018; KRAATZ et al., 2018a).

Anticorpos anti-Gn geralmente não tem atividade neutralizante sendo que quase todos são direcionados contra as glicoproteínas e mais pronunciadamente contra Gc, sugerindo que Gc associada a partículas virais é mais imunogênico do que Gn sendo o principal alvo da resposta imune humoral (WERNIKE et al., 2015a).

Um estudo comparou a similaridade do genoma do SBV com outras sequencias e observou-se maior similaridade com o vírus Shamonda (segmento S, 97% de identidade), vírus Aino (segmento M, 71% de identidade) e vírus Akabane (segmento L, 69% de identidade), todos detectados em bovinos do Japão (HOFFMANN et al., 2012).

Em outro estudo foi relatado que o segmento M dos orthobuniavírus Sathuperi e Douglas exibe maior identidade com SBV, ao passo que os segmentos S e L estão mais próximos do vírus Shamonda (DOCEUL et al., 2013; FISCHER et al., 2013b).

Resultados contraditórios foram publicados quanto a origem do SBV. Estudos sugeriram que os 3 segmentos genômicos do SBV poderiam ser o resultado de rearranjo entre o segmento M do vírus Sathuperi e os segmentos S e L do vírus Shamonda. Nenhuma proteção cruzada foi relatada entre eles, embora uma investigação sorológica demonstrou que os vírus Douglas e Sathuperi são neutralizados pelo soro anti-SBV, mas o vírus Shamonda não (DOCEUL et al., 2013; FISCHER et al., 2013b).

Um outro estudo realizou tanto análise genômica completa quanto sorológicas de nove viroses pertencentes ao sorogrupo Simbu (Aino, Douglas, Peaton, Sabo, Sango, Sathuperi, Shamonda, Shuni e Simbu) e sugeriu que o SBV provavelmente não seja um recombinante, mas sim um dos ancestrais do SHAV, enquanto o SHAV é um rearranjo que compreende os segmentos S e L do SBV e o segmento M de um vírus não classificado, hipótese essa apoiada pela reação sorológica cruzada (GOLLER et al., 2012; WERNIKE; ELBERS; BEER, 2015).

Os bunyavírus podem evoluir basicamente por meio de dois mecanismos: acúmulo de mutações porque a RNA polimerase viral RNA-dependente é propensa a erros devido a falta de capacidade de revisão e rearranjo do segmento do genoma, o que resulta em alterações antigênicas mais dramáticas (EFSA, 2014).

Dos 3 segmentos, os segmentos S e L tanto no hospedeiro mamífero como no vetor artrópode possuem alta estabilidade genética e o segmento M é o mais variável dentro da sequência codificadora da glicoproteína Gc (ectodomínio hipervariável) e independente tanto das espécies hospedeiras como também da área a partir da qual as amostras foram derivadas. A relevância desta região hipervariável para a replicação do vírus, a patogenicidade, a virulência, a antigenicidade, as interações dos receptores ou a adaptação do hospedeiro-vetor ainda não é conhecida e, portanto, precisa ser investigada, por exemplo, usando a genética reversa. Como essas mutações já foram consistentemente presentes há pelo menos 2 anos, podem ter acontecido durante a adaptação a ruminantes ou insetos europeus e poderiam fornecer uma vantagem de crescimento dentro do hospedeiro individual ou podem ser benéficas para a transmissão entre hospedeiro e vetor (WERNIKE et al., 2014, 2015b; KĘSIK-MALISZEWSKA et al., 2018).

Um estudo realizado na Alemanha a fim de investigar as variações genéticas geográficas, sequenciou e analisou filogeneticamente a ORF da proteína N completa, a ORF de NSs codificado por S e as ORFs de glicoproteína codificados em M, de várias amostras de campo positivas para SBV originárias de toda a Alemanha de 2011 e 2012 e de diversos hospedeiros (ovinos, bovinos e caprinos). Observou que a variabilidade do genoma do SBV é alta dentro da região N-terminal da proteína Gc putativa e que esse processo de mutação parece ser independente das espécies hospedeiras e da região geográfica (FISCHER et al., 2013a).

Estudos recentes propuseram que a variabilidade da sequência poderia ser maior em ovinos do que em bovinos. No entanto, quando essas sequências são agrupadas de acordo com o tipo de amostra (sangue de animal em viremia e de tecidos de fetos malformados) em vez de espécies, observa-se uma estabilidade alta do genoma do vírus em animais virêmicos (em vários anos e diversos países europeus) e uma variabilidade alta na região codificadora da glicoproteína Gc (parte amino terminal) em fetos malformados. Assim, sugeriu-se que o genoma de vírus detectado em sangue de animais virêmicos representa as estirpes de SBV em circulação e o detectado em amostras de tecidos de fetos malformados representam as estirpes de SBV não circulantes e que persistiram nesses fetos por semanas ou meses. Portanto, a frequência de mutações provavelmente não são relacionados com as espécies animais e sim com o modo de transmissão e a biologia viral (WERNIKE; BEER, 2018).

Devido ao SBV ter que se adaptar a dois hospedeiros diferentes (artrópode e mamífero) é necessária uma alta estabilidade genética das estirpes circulantes detectáveis no vetor e em animais em viremia, para que ocorra a transmissão viral do hospedeiro mamífero para o inseto. Os vírus presentes em animais malformados, além de não serem transmitidos ao vetor, se replicam na presença de títulos de Ac (quando o feto é imunocompetente e desenvolve Ac específicos numa infecção contínua) e assim a mutação poderia estar envolvida em mecanismos de evasão imune, como a região do genoma em que as mutações ocorrem representa um domínio imunogênico chave do SBV. Assim a variabilidade genética do SBV está muito mais relacionada ao tipo do material da amostra o qual o vírus foi isolado do que espécie hospedeira e região geográfica, sendo que para a classificação do vírus e estudos moleculares-epidemiológicos, apenas estirpes circulantes de infecções agudas de animais adultos ou vetores devem ser utilizadas (WERNIKE; BEER, 2018).

A análise de sequências do segmento S do SBV proveniente de um rebanho ovino belga e coletadas durante os verões de 2011 e 2012 (período de disseminação viral) revelou uma diversidade de sequências intra-rebanho que ocorreram após infecções transplacentárias. Observou-se uma baixa taxa de substituição não-sinônima na proteína N comparando-se com a sequência da proteína não estrutural NSs evidenciando a conservação da sequência da proteína N e certa variabilidade da sequência NSs, independentemente do período de tempo (COUPEAU et al., 2016).

Assim, o SBV tem uma taxa de mutação relativamente baixa, tanto *in vitro* como *in vivo* como também é relativamente estável ao longo do tempo, sendo que a porção mais variável do genoma é a região N-terminal do Gc dentro do segmento M (STAVROU et al., 2017; KEŞIK-MALISZEWSKA et al., 2018).

3.10 DIAGNÓSTICO

3.10.1 Diagnóstico Clínico e Anatomopatológico

O SBV representa um grande desafio tanto no diagnóstico clínico como anatomopatológico, uma vez que a infecção em animais adultos e não prenhes causa nenhuma ou apenas manifestações clínicas transitórias e não específicas e a infecção fetal pode levar a malformações tanto no sistema nervoso central (SNC) como músculo esquelético, confundíveis com outras doenças (HERDER et al., 2012).

Em animais adultos observa-se perda da condição corporal, diminuição na produção de leite (até 50%), diarreia e febre (que dura aproximadamente 2 a 3 semanas), com recuperação total em 2 a 3 semanas (GARIGLIANY et al., 2012a; PAWAIYA, 2013, LIEVAART-PETERSON et al., 2015).

Nas fêmeas ruminantes prenhes que são infectadas durante um período crítico de gravidez, o SBV pode causar aborto e malformações congênitas como distúrbios neurais e músculos esqueléticos (Síndrome da Artrogripose-Hidranencefalia) incluindo braquialgia inferior, curvatura da coluna vertebral (cifose, lordose ou escoliose), artrogripose, anquilose, torcicolo e hidranencefalia. Animais nascidos vivos apresentam sinais neurológicos que incluem: ataxia, tetania, paresia, movimentos de pedalagem e caminhada em círculo, que são observados individualmente ou em combinação (BILK et al., 2012; HERDER et al., 2012).

3.10.2 Diagnóstico Laboratorial

Como as manifestações clínicas da infecção por SBV são inespecíficas e podem ser confundidas com outras doenças como Diarreia Viral Bovina (BVD), Língua Azul (BTV), Doença Hemorrágica Epizootica (EHD), entre outras, o apoio laboratorial é imprescindível no diagnóstico do SBV.

Em um estudo de avaliação global do diagnóstico primário do SBV por veterinários realizado entre 2011 a 2017, mostrou confiabilidade de 63,19%, ou seja, em cada 100 casos suspeitos 63,19 foram confirmados por diagnósticos laboratoriais, sendo que é mais fácil para veterinários reconhecerem o SBV em ovinos (70,38%), bovinos (60,4%) e caprinos (48,57%) respectivamente. Esses dados demonstram um diagnóstico laboratorial eficaz (pois trata-se de uma doença recente) e que a infecção foi mais claramente expressa em ovinos do que em bovinos e caprinos (BOUCHEMLA et al., 2018).

Em casos suspeitos de infecção aguda por SBV, amostras de sangue com EDTA e soro devem ser coletadas e encaminhadas ao laboratório refrigeradas ou congeladas. Em casos suspeitos de fetos abortados e natimortos, amostras de tecidos dos mesmos (preferencialmente SNC) assim como sangue pré-colostral, mecônio, fluido amniótico e placenta devem ser encaminhadas ao laboratório refrigeradas ou congeladas (OIE, 2019; PAWAIYA, 2013).

A detecção do RNA do SBV no sangue de bovino infectado permite o monitoramento de casos agudos da doença, sendo que o período de viremia é curto (1 a 6 dias sendo que o período de incubação é de 1 a 5 dias) seguido de soroconversão dentro de aproximadamente 1

a 3 semanas após a infecção sendo que anticorpos contra o SBV persistem por pelo menos 6 anos (SCHULZ et al., 2015).

O SBV pode ser diagnosticado laboratorialmente tanto por métodos diretos como indiretos.

3.10.2.1 Diagnóstico Direto

Dentre os métodos diretos de detecção, destaca-se a reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) baseados no segmento L ou S do genoma do SBV. Esta técnica tem sido muito utilizada nos últimos anos, por ser um teste rápido e de alta sensibilidade e especificidade, pois possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nos quais os microrganismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou até mesmo em amostras altamente diluídas. Inicialmente, um protocolo que visa a amplificação de um trecho de 88 pb do segmento S do genoma do SBV foi desenvolvido pelo FLI e posteriormente amplamente implementado nos laboratórios da Europa (BILK et al., 2012; DOCEUL et al., 2013, OIE, 2019).

Também já foi desenvolvida uma RT-qPCR genérica baseada no segmento S (que embora seja considerada a região genômica mais conservada dentro de espécies individuais dos orthobunyavirus, contém variação suficiente para permitir a discriminação entre os diferentes vírus do sorogrupo Simbu) para a detecção universal dos vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu (215 pb) e que permite a identificação da espécie do vírus pelo sequenciamento genético. Esse sistema pode ser usado como primeira ferramenta diagnóstica laboratorial em áreas de ocorrência das infecções virais do sorogrupo Simbu (GOLENDER et al., 2018).

Estudos demonstraram que em fetos abortados, amostras de cérebro, fluido placentário externo e cordão umbilical e medular são os tecidos mais adequados para a detecção direta do SBV, sendo que o tronco encefálico apresenta o maior título viral. Mas o SBV pode ser detectado também em outras amostras de tecidos de fetos abortados e placenta (BILK et al., 2012; DOCEUL et al., 2013; LALOY et al., 2017a).

Também é possível a detecção do SBV em amostras de sêmen de touros infectados. Porém, como trata-se de uma amostra com muitos componentes inibitórios nos resultados de PCR, é crítico um método de extração altamente eficaz e que reduza esses efeitos inibitórios (SCHULZ et al., 2015; WERNIKE; BEER; HOFFMANN, 2016, 2017).

Os ensaios de RT-qPCR também são utilizados para a detecção do SBV em insetos vetores (COLLINS et al., 2019).

Outro método direto de detecção é a realização do isolamento do SBV em cultivo celular, que é permissivo em células VERO (epitélio de rim de macaco verde africano), células BHK-21 (fibroblasto de rim de hamster bebê) ou KC (*Culicoides variipennis larvae*) a partir de amostras de SNC e outros tecidos de fetos abortados, soro ou sangue e induz efeito citopático (CPE) na maioria dessas linhas celulares. Células SK-6 (rim suíno) também são altamente susceptíveis ao SBV, apesar de o SBV se replicar de maneira ineficiente em suínos (HOFMANN et al., 2015; ILCHMANN; ARMSTRONG; CLAYTON, 2017; SUDHAKAR et al., 2020).

3.10.2.2 Diagnóstico Indireto

Dos testes indiretos de detecção, destaca-se a reação de vírusneutralização, para pesquisa de anticorpos em soros de animais. No entanto, trata-se de um teste demorado (4 a 6 dias) e não automatizado (LOEFFEN et al., 2012). Também é possível realizar sorologia pela técnica de reação de imunofluorescência indireta ou ELISA indireto, sendo que o mais amplamente utilizado é um ELISA comercial baseado em um antígeno de nucleoproteína recombinante do SBV, produzido por IDvet (França), o qual foi validado pelo Laboratório de Saúde Animal da Agência Francesa de Segurança Alimentar, Ambiental e de Saúde e Segurança no Trabalho (ANSES) em Maisons-Alfort (Laboratório Alfort ANSES) em abril de 2012 e atualmente fornece uma técnica altamente sensível, específica e robusta para o diagnóstico sorológico e estudos de vigilância do SBV. No entanto, existem também na literatura alguns protocolos de ELISA indireto *in-house* desenvolvidos e validados (DOCEUL et al., 2013; HEIJDEN et al., 2013; PAWAIYA, 2013, OIE, 2019).

Ainda não foi relatada a detecção do RNA do SBV no leite, mas Ac contra o SBV já foi detectado em amostras de leite de vacas tanto individuais como em tanque. Assim, a pesquisa de anticorpos anti-SBV por ELISA para leite em tanque a granel ou de indivíduos pode ser usado como ferramenta de vigilância como também para prever a imunidade de rebanho, o que forneceria informações para busca de programas tanto econômicos como de controle de infecção do SBV (DALY et al., 2015; COLLINS et al., 2017a; ROTOLO; MAIN; ZIMMERMAN, 2018).

3.11 CONTROLE, TRATAMENTO E PROFILAXIA

Segundo a OIE e a Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013 (MAPA, 2013a), SBV não faz parte da lista de doenças de notificação obrigatória, entretanto no Brasil, independentemente da relação de doenças listadas, a notificação obrigatória e imediata inclui qualquer doença animal nunca registrada no País, que é o caso do SBV. Atualmente não existe um tratamento específico contra o SBV. A melhor forma de controle é através do controle do mosquito vetor, mas deve-se ser cuidadoso e consciente para seu combate, com uso de inseticidas por exemplo, para não causar um desequilíbrio ambiental.

A vacinação pode ser usada taticamente para quebrar a cadeia de transmissão do SBV e reduzir sua disseminação. A incorporação de conhecimentos sobre a preferência de alimentação dos vetores pode fornecer uma oportunidade de romper a cadeia de transmissão vacinando animais com maior risco de infecção (BESSELL et al., 2014).

Em 2013 foram desenvolvidos quatro protótipos de vacinas inativadas que impediram completamente a RNAemia após infecção desafiada, necessitando de estudos mais aprofundados para avaliações adicionais quanto a duração da imunidade, por exemplo. Em 2014 foi desenvolvida também uma vacina candidata inativada e dose única em ovelhas, que resultou inibição completa de viremia em animais desafiados. Em 2015 foi desenvolvida uma vacina candidata viva modificada (dupla deleção NSs/ NSm) que não induziu replicação viral ou doença clínica detectável após a imunização, além de proteção total contra infecção desafiada (WERNIKE et al., 2013b; HECHINGER; WERNIKE; BEER, 2014; KRAATZ et al., 2015).

Anticorpos monoclonais gerados em camundongos inoculados com o vírus inteiro possuem alto grau de antigenicidade contra o domínio N-terminal da proteína Gc (associada a atividade neutralizadora) assim como pela proteína N. Já foi demonstrado que o ectodomínio da glicoproteína Gc (678-947 aa) e a nucleoproteína N podem servir como alvos imunológicos contra a infecção pelo SBV e são fortes candidatos para a vacina de DNA (BOSHRA et al., 2017).

A antigenicidade do domínio N-terminal da proteína Gc do SBV (234 aminoácidos) também foi recentemente demonstrada como base promissora para uma nova vacina mediada por subunidade, o que permite a diferenciação de animais vacinados e infectados a campo, uma vez que a grande maioria dos kits de ELISA comerciais utilizam como base a proteína N do SBV (WERNIKE et al., 2017).

Atualmente existem diversas vacinas específicas contra o SBV disponíveis comercialmente sendo as principais: Bovilis®SBV (Intervet UK Ltd, Milton Keynes,

Buckinghamshire, Reino Unido), SBVvax (Merial SAS, Lyon, França) e Zulvac[®] SBV (Zoets Belgium AS, Bélgica) para serem aplicadas em ovinos e bovinos e comercializadas na Europa a partir de maio de 2015, todas compostas por vírus inativados (KAUFFOLD; VAHLENKAMP; HOOPSA, 2014; WERNIKE et al., 2014).

No entanto, vários anos de pouca ou nenhuma doença clínica e uma falta de clareza sobre o impacto econômico da SBV como também sua abrangência mundial resultaram em baixa adesão ao uso da vacina (STAVROU et al., 2017).

Medidas adicionais de controle podem ser aplicadas, como criação inteligente minimizando o número de animais prenhez no outono, quando a atividade dos insetos atinge seu máximo. O uso de repelentes, inseticidas e piretróides também podem ser levados em consideração para reduzir o nível de exposição de animais suscetíveis a vetores infectados (KAUFFOLD; VAHLENKAMP; HOOPSA, 2014; WERNIKE et al., 2014).

3.12 IMPACTO

Desde o seu surgimento no final de 2011, o SBV se espalhou extremamente rápido e causou uma grande epidemia em animais europeus. O impacto causado por SBV ainda está em análise, mas parece ser baixo ou limitado na saúde animal em nível de rebanho. Em animais adultos, pode ser inaparente ou apresentar sinais não específicos de doença, sendo que a recuperação ocorre dentro de alguns dias para animais individuais e dentro de 2 a 3 semanas para rebanho. As taxas de morbidade de rebanho podem ser altas (20 a 70%) e mortalidade é inferior a 3% e parece estar principalmente relacionada a fetos abortados. Testes de soroprevalência encontram níveis detectáveis de anticorpos em 70 a 100% dos bovinos e ovinos (DOCEUL et al., 2013; WERNIKE et al., 2014; TIWARI et al., 2018).

Os principais impactos do SBV no agronegócio são decorrentes de perdas de produção de leite, perdas reprodutivas como consequência do aborto e malformações fetais, custo de compra de estoque de substituição para compensar perdas reprodutivas e animais de reposição não vendidos, assim como custos veterinários e restrição de movimentação, sendo que um dos principais impactos econômicos do surto inicial do SBV foi a perda de mercados de exportação de genética bovina (sêmen, embriões e reprodutores) devido à introdução de barreiras comerciais de países livres de SBV (STAVROU et al., 2017; VELDHUIS et al., 2019).

Assim, o impacto mais significativo do SBV foi devido a restrições ao comércio internacional de países da UE, principalmente de animais vivos, sêmen e embriões, resultando em consideráveis perdas financeiras. Entre 2011 e 2012, o valor de exportação dos animais de

raça pura diminuiu 20% e em 2012 houve uma queda estimada de 11 a 26% no número de doses de sêmen (aproximadamente 8,9 milhões de doses) exportadas pela Europa (COLLINS et al., 2019).

As perdas de animais devido a abortos, natimortos e fetos malformados atingiram 50% em ruminantes na Europa durante o período de parição de 2011 e 2012 (HELMER et al., 2019).

Na Holanda entre 15 de agosto e 19 de setembro de 2011, a perda média na produção de leite por vaca foi de -0.26 kg (95% CI: -0,30; -0,22) por dia em rebanhos leiteiros e impacto nulo ou limitado nas taxas de mortalidade (VELDHUIS et al., 2019).

Um estudo realizado na Suíça estimou os efeitos da infecção aguda do SBV na saúde animal, fertilidade, produção de leite e as perdas financeiras resultantes da redução da produção de leite, redução da fertilidade e morte ou malformações de bezerros afetados. Revelou associação significativa entre a infecção aguda do SBV e o rendimento do leite, a taxa de aborto e os custos veterinários, mas nenhum efeito foi detectado em relação a outros parâmetros de fertilidade como dificuldades no parto, retenção de placenta etc. Agricultores relataram uma redução duradoura na produção de leite e perdas econômicas importantes em suas fazendas, mas o impacto a nível nacional pareceu ser moderado. No entanto, pode ser grave o impacto econômico da doença clínica, em particular em fazendas com alta morbidade dentro do rebanho, e uma queda pronunciada na produção de leite (WÜTHRICH et al., 2016).

Em um estudo realizado na França em 2014 avaliou que o impacto do SBV foi principalmente devido ao nascimento de fetos natimortos ou com mal formações congênitas e abortos (em média 8% dos cordeiros e 3% dos bezerros em rebanhos infectados apresentaram deformidades típicas do SBV), além da diminuição do desenvolvimento reprodutivo (aumento de repetição de cio e diminuição do número de vacas prenhas), dados esses relatados pelos agricultores locais (DOMINGUEZ et al., 2014).

A associação entre sinais clínicos e parâmetros de produção e fertilidade em vacas leiteiras individuais, ou seja, em nível animal, foi avaliada na Suíça após a epidemia do SBV no verão de 2012 e, apesar de notar-se uma pronunciada diminuição na produção de leite em animais com e sem manifestações clínicas, observou-se um efeito prolongado sobre a produção de leite em animais com manifestações clínicas, os quais não retornaram ao nível anterior de produção de leite. Em nível nacional, o impacto da epidemia de SBV foi considerado limitado. No entanto, as perdas de produção de leite em fazendas e em animais individuais foram consideradas substanciais, principalmente em propriedades com alta prevalência de doença clínica (LECHNER et al., 2017).

Assim, o impacto geral do SBV difere entre os países afetados devido as diferenças tanto nos sistemas de produção como manejo intensivo alojado em recinto fechado, recriação durante todo ano, rebanhos leiteiros, pastoreio extensivo, entre outros (VELDHUIS et al., 2019).

3.13 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Perante a emergência do SBV na Europa em 2011 e re-emergências nos anos posteriores assim como expansão para outras regiões, o Brasil adotou algumas medidas de emergência restritivas para evitar a introdução do SBV em território nacional.

Em fevereiro de 2012 e por duração não especificada, o Brasil impôs restrições à importação de produtos da União Europeia relacionados ao vírus Schmallenberg (G/SPS/N/BRA/798). Pelo memorando circular 23/2012- DSA (MAPA), a importação de material genético de ruminantes de países que notificaram ou notificarão a doença foi suspensa e cancelamento das licenças de importação emitidas anteriormente (WTO, 2019).

Em junho de 2012 (G/SPS/N/BRA/798/Add.1) foram estabelecidas condições sanitárias para permitir a importação de material genético de ruminantes provenientes de países com casos notificados de vírus Schmallenberg (Resolução MERCOSUL/GMC/RES. nº 28/12). A importação de animais vivos de países com casos notificados da doença permaneceu suspensa (WTO, 2019).

A Instrução Normativa MAPA nº 10, de 5 de março de 2013 incorporou ao ordenamento jurídico nacional os "Requisitos zoossanitários adicionais dos Estados Partes para a importação de sêmen e embriões de ruminantes com relação à doença de Schmallenberg", aprovados pela Resolução MERCOSUL/GMC/RES. nº 28/12 (MAPA, 2013).

Dois anos depois, a Instrução Normativa MAPA nº 12, de 28 de maio de 2015 (G/SPS/N/BRA/798/Rev.2) incorporou ao ordenamento jurídico nacional os "Requisitos zoossanitários adicionais dos Estados Partes para a importação de sêmen e embriões de ruminantes com relação à doença de Schmallenberg" aprovados pela Resolução GMC - MERCOSUL/RES. nº 45/14 e revogou a Instrução Normativa MAPA nº 10, de 5 de março de 2013 (MAPA, 2015).

A Resolução MERCOSUL/GMC/RES. nº 45/14 considera que a doença de Schmallenberg difundiu-se rapidamente por distintos países da Europa e não há registros da enfermidade nos Estados Partes e evidência científica suficiente que permita excluir o risco de transmissão do vírus por meio de sêmen e embriões de ruminantes.

Para importação de sêmen de ruminantes pelos Estados Partes, os seguintes requisitos zoossanitários deverão ser certificados pelo país de origem, no que se refere à doença de Schmallerberg:

I. o sêmen a ser exportado deverá ser originário de país que nunca registrou casos da doença de Schmallerberg; ou,

II. o sêmen a ser exportado deverá ter sido coletado antes de 1º de junho de 2011; ou,

III. não deverão ter sido registrados casos da doença de Schmallerberg em centro de inseminação artificial, no lapso de tempo transcorrido entre os trinta (30) dias prévios à coleta do sêmen e os trinta (30) dias posteriores à última coleta do sêmen a ser exportado;

e,

os doadores do sêmen a ser exportado deverão ter resultados negativos a dois testes sorológicos recomendados pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), sendo o primeiro efetuado sobre uma amostra tomada no dia da primeira coleta do sêmen a exportar, ou dentro dos trinta (30) dias anteriores, e o segundo efetuado sobre uma amostra tomada entre vinte e um (21) e sessenta (60) dias posteriores à última coleta do sêmen a exportar.

Para importação de embriões de ruminantes pelos Estados Partes, os seguintes requisitos zoossanitários deverão ser certificados pelo país de origem, no que se refere à doença de Schmallerberg:

I. os embriões a serem exportados deverão ser originários de um país que nunca registrou casos da doença de Schmallerberg;

ou,

II. os embriões a serem exportados deverão ter sido coletados antes de 1º de junho de 2011; ou,

III. não deverão ter sido registrados casos da doença de Schmallerberg nos animais residentes do estabelecimento de origem e/ou coleta, no lapso de tempo transcorrido entre os trinta (30) dias prévios à coleta dos embriões e os trinta (30) dias posteriores à última coleta de embriões a serem exportados;

e,

as doadoras dos embriões a serem exportados deverão ter resultados negativos a dois testes sorológicos recomendados pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), sendo o primeiro efetuado sobre uma amostra tomada no dia da primeira coleta dos

embriões a exportar ou dentro dos trinta (30) dias anteriores, e o segundo efetuado sobre uma amostra tomada entre vinte e um (21) e sessenta (60) dias posteriores à última coleta dos embriões a exportar;

IV. o sêmen utilizado para a produção dos embriões a serem exportados deverá cumprir com as condições estabelecidas nos requisitos zoossanitários para importação de sêmen de ruminantes pelos Estados Partes no que se refere à doença de Schmallenberg.

A única atualização da Resolução MERCOSUL/GMC/RES. n° 28/12 para a Resolução MERCOSUL/GMC/RES. n° 45/14 foi a respeito do primeiro resultado negativo aos testes sorológicos das doadoras de embrião quanto a importação de embriões, sendo o primeiro efetuado sobre uma amostra tomada no dia da primeira coleta dos embriões a exportar, e o adendo na n° 45/14 da opção dentro dos trinta (30) dias anteriores (MAPA, 2015a).

A Instrução Normativa n° 38, de 25 de julho de 2018 incorporou ao ordenamento jurídico nacional os "Requisitos Zoossanitários dos Estados Partes para a Importação de Embriões de Bovinos e Bubalinos Coletados *in vivo* e, ou produzidos *in vitro*" aprovados pela Resolução GMC - MERCOSUL n° 44/17 e revogou a Instrução Normativa n° 23, de 21 de junho de 2013 (MAPA, 2018a).

A Resolução GMC - MERCOSUL n° 44/17 estabeleceu os requisitos zoossanitários dos Estados Partes para a importação de embriões de bovinos e bubalinos coletados *in vivo* e, ou, produzidos *in vitro*. Ela revogou a RES. GMC n° 25/10 e considerou a Resolução GMC - MERCOSUL n° 45/14 (MAPA, 2018a).

A Instrução Normativa n° 36, de 27 de outubro de 2015 incorporou ao ordenamento jurídico nacional os "Requisitos Zoossanitários dos Estados Partes para a Importação de Sêmen Bovino e Bubalino Congelado" aprovados pela Resolução GMC - MERCOSUL n° 49/14. Ela revogou a Instrução Normativa MAPA n° 8, de 10 de março de 2006 e a Instrução Normativa MAPA n° 40, de 4 de setembro de 2007 e considerou a Resolução GMC n° 45/14 (MAPA, 2015).

A Instrução Normativa n° 20, de 24 de abril de 2018 incorporou ao ordenamento jurídico nacional os "Requisitos zoossanitários adicionais dos Estados Partes para a importação de ruminantes com relação à doença de Schmallenberg" aprovados pela Resolução GMC - MERCOSUL n° 27/17 (MAPA, 2018b).

MERCOSUL/GMC/RES. n° 27/17 diz que a doença de Schmallenberg está amplamente distribuída por distintos países da Europa e que não existem registros desta nos Estados Partes tornando imprescindível a adoção de medidas de mitigação de risco capazes de prevenir a

introdução da doença no MERCOSUL, no caso de importação de ruminantes procedentes de países que registraram casos. No caso em que os Estados Partes importem ruminantes, o país de origem deverá certificar que os animais:

- I. sejam originários de um país onde nunca se tenham registrado casos da doença de Schmallenberg;
ou,
- II. no caso de que sejam originários de países onde se tenham registrado casos da doença de Schmallenberg:
 - i) provenham de um estabelecimento onde não tenha havido evidências clínicas nem sorológicas da doença durante pelo menos os seis (6) meses anteriores ao início da quarentena;
 - ii) tenham sido submetidos a uma quarentena sob supervisão oficial em um estabelecimento onde não tenha havido evidências clínicas nem sorológicas da doença, assim como em um raio de dez (10) Km deste, durante os trinta (30) dias prévios ao embarque;
 - iii) tenham sido submetidos a uma prova de ELISA, ou Imunofluorescência indireta, ou Vírusneutralização com resultado negativo realizada pelo menos vinte e um (21) dias posterior ao início da quarentena;
 - iv) tenham sido protegidos contra vetores em todo momento, desde o início da quarentena até seu embarque no ponto de saída do país exportador (MAPA, 2018b).

O Brasil não é um importador significativo de gado vivo, porém é um grande importador de genética de bovinos de corte, sendo que os Estados Unidos é um fornecedor tradicional de sêmen bovino para o Brasil. A participação média de mercado de sêmen do Estados Unidos caiu de 81% em 2017 para 48% em 2018, enquanto a participação de mercado do Canadá aumento de 13 % em 2017 para 22% em 2018. Em 2019 é esperado que as importações de sêmen bovino aumentem devido à disponibilidade de fundos governamentais a taxas de juros subsidiadas para o programa de melhoramento genético bovino (FLAKE et al., 2019).

Em 2019 é esperado um aumento de mais de 25% nas exportações de gado, um recorde histórico de um milhão de cabeças, sendo que o Brasil finalizou acordos sanitários em 2018 com diversos países como Vietnã e estão em andamento negociações para acordos sanitários com outros países. Desde 2016, o maior comprador de bovinos vivos do Brasil é a Turquia. No ano de 2018 o país foi responsável por 77,6% do volume embarcado. O Egito é o segundo maior

comprador, respondendo por 9,1%, seguido pelo Líbano com 6,2%, Jordânia com 3,9% e Iraque com 3,2% (FLAKE et al., 2019).

Para que possam ser importados para União Europeia, os ungulados vivos devem cumprir os requisitos de sanidade animal estabelecidos na Diretiva 2004/68 /CE do Conselho que estabelece normas de saúde animal referentes à importação e ao trânsito de determinados animais ungulados vivos. Esta diretiva harmoniza as regras e estabelece as condições gerais de sanidade animal para a importação de bovinos, garantindo que os mesmos princípios para a importação de bovinos sejam aplicados em todos os Estados Membros da União Europeia e impedir que animais entrem no território portando doenças infecciosa perigosas para os animais e seres humanos (EUR-Lex, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para investigar a ocorrência do SBV no Brasil, inicialmente foi estabelecido diagnóstico laboratorial e posteriormente foram testadas amostras de sangue total, pool de órgãos de fetos abortados e soro.

4.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO DO SBV

Para a realização do diagnóstico direto do SBV, inicialmente foi padronizada e validada uma RT-qPCR e posteriormente foram testadas as amostras de sangue total e pool de órgãos dos fetos abortados e natimortos.

4.1.1 Desenvolvimento Controle Positivo

Por motivos de biosegurança, como controle positivo padrão no diagnóstico molecular do SBV foi construída uma sequência sintética gBlocks® Gene Fragments (Integrated DNA Technologies- IDT) que são fragmentos de DNA de cadeia dupla, sintetizados em laboratório e verificados em sequência.

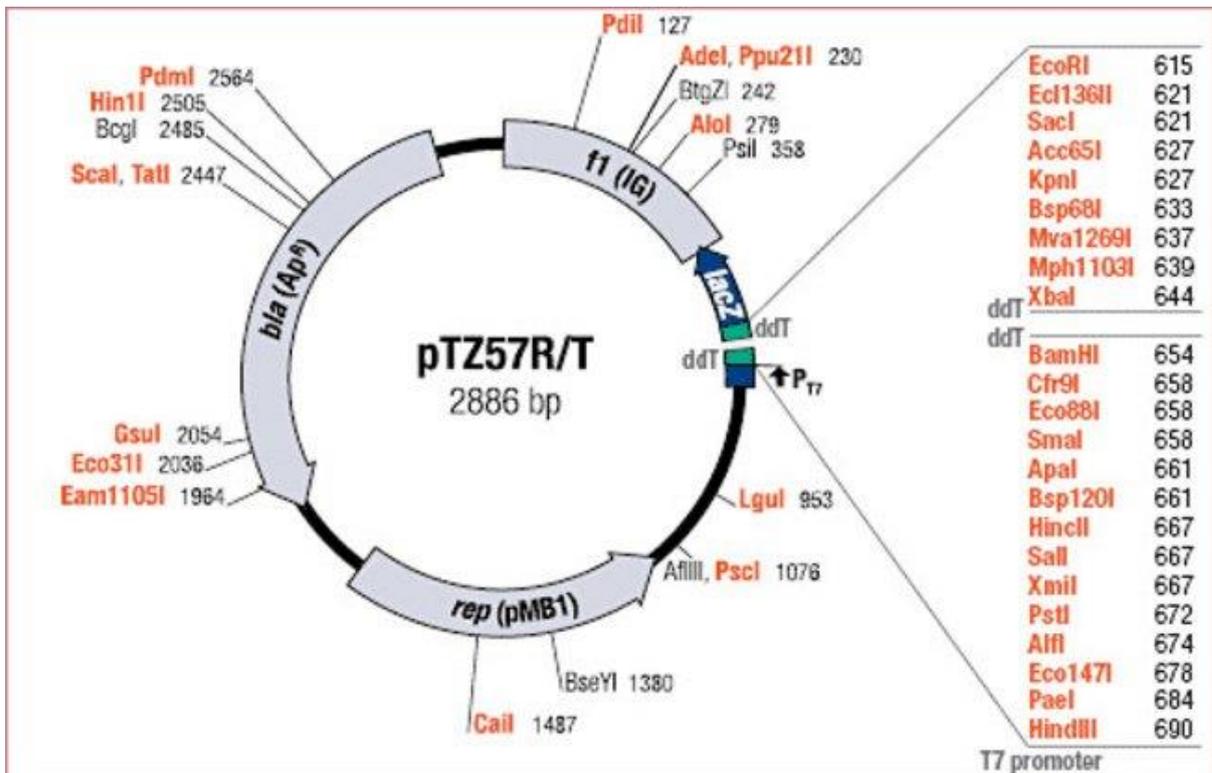
Para a construção do gBlocks®, utilizou-se como referência o segmento S do genoma do SBV (*strain* BH80/11-4, número de acesso no GenBank HE649914.1), altamente conservada. A sequência do gBlocks® foi composta pelo trecho do segmento S que abrange a região de hibridização dos *primers* e sonda (que envolve a parte que codifica a proteína N e NSs) acoplado na extremidade 5' a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *EcoRI* (G/AATTC). Do mesmo modo, na extremidade 3', foi adicionada a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *BamHI* (GG*ATCC). Após as sequências das enzimas de restrição, foram adicionadas 5 timinas em cada extremidade para evitar inespecificidades.

Para garantir o grau de identidade, conservação e representatividade dos SBV circulantes no mundo, a sequência final do gBlock® foi alinhada e comparada com todas as sequências do segmento S do genoma do SBV depositadas no GenBank até o momento da análise.

Para a clonagem do gBlocks®, foi utilizado o plasmídeo pTZ57R/T (figura 6) proveniente do KitInsTAclone PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific). Inicialmente ambos (plasmídeo e gBlocks®) foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição

EcoRI e *BamHI* sendo que a reação (volume final de 30 μ L) foi composta de: 2X de Tango[®] buffer 10X (Thermo Fisher Scientific), 1X *EcoRI*, 2X *BamHI*, 100 ng de gBlocks[®] e, separadamente, 1000 ng de plasmídeo. Incubou-se ambos à 37 °C por 2 h30 min.

Figura 6 : Mapa de restrição do vetor pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit- Thermo Fisher Scientific).



Os produtos digeridos foram purificados utilizando o kit GFX[®] PCR DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com o manual do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados utilizando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e, posteriormente, ligados ao vetor pTZ57R/T com a enzima T4 DNA Ligase (Promega[®]), conforme protocolo do fabricante.

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa JM109 foi utilizada para realizar a propagação dos vetores recombinantes. Para a introdução dos plasmídeos recombinantes na bactéria, foi utilizado o procedimento de transformação físico.

No preparo das bactérias competentes, inicialmente foi realizado um pré-inóculo de uma colônia isolada, previamente semeada no meio LB ágar sem antibiótico (1 g triptona; 0,5 g extrato de levedura, 1 g NaCl; 1,5 g ágar; q.s.p. 100 mL) em 3 mL de meio SOB (2,4 g triptona; 0,6 g extrato de levedura; 0,06 g NaCl, 1,2 mL KCl 250 mM; q.s.p. 100 mL), e incubou-se a 37 °C sob agitação de 180 rpm *overnight* (aproximadamente 16 h). Uma alíquota de 1 mL dessa cultura foi transferida para 100 mL de meio SOB sem antibiótico e incubada a 37° C a 200 rpm

até atingir absorvância de 0,5 a 0,6 em um comprimento de onda de 600 nm (A_{600}). Posteriormente, os 100 mL da cultura foi colocada no gelo e adicionou-se 1 mL de $MgCl_2$ (1 mol/L) gelado. Incubou-se no gelo por 15 min a 1 h e dividiu-se a cultura em dois frascos e centrifugou-se a 3000 x g por 15 min a 4 °C. Descartou-se gentilmente o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de $CaCl_2$ 50 nM estéril e gelada. Incubou-se em gelo por 15 min e centrifugou-se a 3000 x g por 5 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o *pellet* em 1 mL de solução estéril e gelada de $CaCl_2$ 50 nM com 15% de glicerol. Foram feitas alíquotas de 100 µL em microtubos estéreis e gelados e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar a *E.coli* cepa JM109 pela transformação física da seguinte forma: plasmídeos recombinantes mais bactérias competentes foram incubadas no gelo por 20 min, seguido de incubação a 42° C por 1 min e 30 s, posteriormente incubou-se no gelo novamente por 2 min, adicionou-se 900 µL em meio LB líquido sem antibiótico e incubou-se a 37 °C por 2 h a 130 rpm.

Semeou-se as bactérias transformadas em meio LB ágar com ampicilina 100 mg/mL (1:1000), 30 µL de IPTG (100 nM) e 20 µL de Xgal (50 mg/mL) e incubou-se a 37 °C por 8 horas.

Os clones foram selecionados com base na coloração da colônia (azul: sem plasmídeos recombinantes/ brancas: com plasmídeos recombinantes).

Para ter certeza que a ligação ocorreu e para confirmar a orientação correta do inserto, foi realizada uma PCR das colônias brancas utilizando 12,5 µL GoTaq[®] Green Master Mix (Promega), 20 µM de cada *primer* M13 (M13/pUCforward 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' e M13/pUC reverse 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') e água *nuclease-free* q.s.p. 25 µL. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 5 min para desnaturação da fita de DNA, 50 °C por 2 min para anelamento dos *primers* e 72 °C por 5 min para a extensão das fitas, com extensão final de 72 °C por 10 min e resfriamento a 4 °C. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR[®] Safe DNA gel Stain (Invitrogen[®]). Foi considerado sucesso da reação de ligação quando os produtos de PCR possuíam tamanho esperado de aproximadamente de 153 pb mais o tamanho do inserto de aproximadamente 813 bp totalizando 966 pb.

Também, para confirmar a inserção e a orientação correta do fragmento inserido, foi realizado o sequenciamento genético das colônias brancas. Para tanto foi utilizado o BigDye[®] Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de

sequenciamento automático 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), conforme recomendação do fabricante e utilizando os *primers senso* ou *reverso* M13, já descritos. Os valores de identidade das sequências de nucleotídeos recombinantes foram calculados usando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 (HALL, 1999) em comparação com as sequências de referência depositadas no GenBank.

Para a extração dos plasmídeos, após crescimento *overnight*, foi utilizado o kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o manual do fabricante.

Posteriormente, os plasmídeos extraídos foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* utilizando 2 µL de Buffer H 10X (Thermo Fisher Scientific); 0,2 µL de BSA 10 µg/µL (Thermo Fisher Scientific); 1,0 µL de *EcoRI* 10 U/mL (Thermo Fisher Scientific); 15 µL do plasmídeo extraído e água *nuclease-free* q.s.p. e incubou-se a 37 °C *overnight*. A digestão do plasmídeo foi conferida por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen) sendo que, se houve a digestão do plasmídeo, uma banda na altura esperada (inseto de 813 pb mais plasmídeo de 2847 pb totalizando aproximadamente 3660 pb) é visualizada, ao passo que se não houve a digestão, três bandas são visualizadas (das fitas simples que desnaturaram, as fitas que naturalmente desnaturaram e a do plasmídeo enovelado).

O produto dos plasmídeos recombinantes digeridos foi purificado utilizando o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com o manual do fabricante e quantificados utilizando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Para realizar a reação de transcrição *in vitro* do produto clonado, foi utilizado o kit MEGAscript® Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) de acordo com recomendações do fabricante. Para degradar o DNA residual, foi utilizado o kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen), de acordo com o manual do fabricante.

Para verificar a degradação residual de moléculas de DNA pela ação da DNase, inicialmente foi realizada transcrição reversa utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com recomendações do fabricante seguida de qPCR one step utilizando o kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) sendo que as condições de reação, *primers* e sonda foram baseados nos descritos por Hoffman e colaboradores (2012). Para a reação, foi utilizado o aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Na qPCR foram utilizados como alvo tanto o RNA transcrito em cDNA como também o não transcrito, ambos foram realizados quatro diluições em série na base 10 (10^{-1} a 10^{-4}). Com base na amplificação ou não, avaliou-se se todo o DNA residual foi degradado ou não.

O RNA sem DNA residual foi então quantificado por NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e QuantiFluor[®] RNA System (Promega). Como o valor obtido está em massa e para verificar a sensibilidade analítica da PCR é necessário verificar o número de cópias por microlitro, faz-se necessário a conversão deste valor. Para isso utilizou-se a seguinte fórmula:

Número de cópias / μL =

$$\frac{6,022 \times 10^{23} \text{ (moléculas / mol)} \times \text{RNA (xg / } \mu\text{L)}}{\text{Número de bases} \times 340 \text{ Da}}$$

Onde,

6.022×10^{23} (moléculas/mol): número de Avogadro.

340 Da: massa de um nucleotídeo de RNA (g/mol).

Também disponível online em <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>.

A partir deste RNA quantificado, foi feita uma diluição inicial e, a partir desta, foram feitas diluições seriadas na base 10 (2 μL do purificado + 18 μL do diluente).

Inicialmente, estas diluições foram feitas em água *nuclease-free* e empregadas para a otimização e avaliação da sensibilidade analítica da RT-qPCR. Posteriormente, essas mesmas diluições foram feitas tanto em extraídos de sangue total como também em pool de órgãos de fetos abortados, sabidamente negativos para SBV, para verificar possíveis inibidores ou algum outro fator que diminuísse a sensibilidade analítica da RT-qPCR.

4.1.2 Padronização e Validação da RT-qPCR

O diagnóstico molecular do SBV foi realizado pela técnica RT-qPCR e para isso foi necessário padronizar e validar a reação.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sonda de hidrólise utilizados detectam a região do segmento S do genoma do SBV, altamente conservada, que codifica a proteína do nucleocapsídeo N e a proteína não estrutural NSs. As sequências dos *primers* e sonda de hidrólise foram descritas por Hoffman e colaboradores em 2012, são recomendadas pela OIE

(2019) e pelo FLI como também são amplamente utilizadas tanto no diagnóstico como em estudos moleculares do SBV. Neste estudo, todas foram previamente analisadas no BLAST. A sequência e posição de hibridação dos *primers* e sonda de hidrólise estão no quadro 1.

A sonda de hidrólise foi conjugada ao 6- carboxy-fluorescein (FAM emissão de comprimento de onda 518 nm) na extremidade 5' (*reporter*) e ZEN-IowaBQ (emissão comprimento de onda 555 nm) na extremidade 3' (duplo *quencher*).

Quadro 1: Sequência dos *primers* e sonda de hidrólise, localização da região de hibridação e tamanho do amplificado. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência referência presente no GenBank número de acesso: HE649914.1.

Nome	Autor	Sequência	Região de hibridação	Fragmento (pb)
SBV-S-382F	(HOFFMANN et al., 2012)	5' TCA GAT TGT CAT GCC CCT TGC 3'	382-402 pb	88 pb
SBV-S-469R		5' TTC GGC CCC AGG TGC AAA TC 3'	469-450 pb	
SBV-S-408FAM		5' FAM-TTA AGG GAT GCA CCT GGG CCG ATG GT (ZEN-Iowa BQ) 3'	408- 433 pb	

Um das etapas da padronização da RT-qPCR foi a avaliação da sensibilidade analítica da reação. Para aperfeiçoá-la, foi realizado gradiente de concentração dos *primers* (tabela 1) inicialmente com a sonda de hidrólise a 150 nM (concentração essa recomendada pelo FLI) e a concentração de RNA viral de 10^3 cópias de RNA/ μ L foi utilizada como controle.

Tabela 1: Gradiente de concentração dos *primers forward* e *reverse* em nM.

		SBV-S-382F						
S B V -S- 469R		400	500	600	700	800	900	1000
	400	400/400	500/400	600/400	700/400	800/400	900/400	1000/400
	500	500/400	500/500	600/500	700/500	800/500	900/500	1000/500
	600	500/400	500/600	600/600	700/600	800/600	900/600	1000/600
	700	700/400	500/700	600/700	700/700	800/700	900/700	1000/700
	800	800/400	500/800	600/800	700/800	800/800	900/800	1000/800
	900	900/400	500/900	600/900	700/900	800/900	900/900	1000/900
	1000	1000/400	500/1000	600/1000	700/1000	800/1000	900/1000	1000/1000

Em segunda etapa, foram testadas as melhores concentrações de *primer* com gradiente de concentração da sonda de hidrólise, conforme tabela 2.

Tabela 2: Gradiente de concentração da sonda de hidrólise em conjunto com as melhores concentrações dos primers em nM.

		SBV-S-408FAM										
SBVS382F/ SBVS469R		90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
	700/800	700/800 90	700/800 100	700/800 110	700/800 120	700/800 130	700/800 140	700/800 150	700/800 160	700/800 170	700/800 180	700/800 190
	800/400	800/400 90	800/400 100	800/400 110	800/400 120	800/400 130	800/400 140	800/400 150	800/400 160	800/400 170	800/400 180	800/400 190

Na RT-qPCR a curva padrão foi gerada através do ponto de corte dos valores do *Quantification cycle* (Cq) em fase linear logarítmica de amplificação frente diluições do vírus, que foram utilizadas para otimização do teste. Os limites de detecção da PCR quantitativa foram determinados como a última diluição na qual todas as reações em triplicata apresentarem resultados positivos.

A sensibilidade analítica foi determinada através da determinação do *threshold* e dos Cq produzidos por cada diluição do vírus padrão da curva padrão fornecidas pelo *software* LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Molecular Systems). A curva padrão foi utilizada para calcular o coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva, para calcular a eficiência da amplificação (*E*). Uma reação de amplificação perfeita com a

eficiência de 2 (isto é, cada produto de PCR é replicado uma vez em cada ciclo) pode ser descrito durante a fase log-linear pela seguinte equação:

$$T_n = T_0 \times 2^n$$

No entanto a PCR é influenciada por uma série de fatores e, portanto, diverge do perfeito. Assim, a amplificação é descrita com maior precisão utilizando a seguinte equação:

$$T_n = T_0 \times E^n$$

Onde,

T_n é a quantidade de moléculas alvo no ciclo n ;

T_0 é o número inicial de moléculas alvo;

n é o número de ciclos de amplificação;

E é a eficiência de amplificação (*slope*).

A curva está associada a uma inclinação de, aproximadamente, -3,32 para cada diluição 1:10 do alvo. O *slope* -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas de DNA amplificadas dobra a cada ciclo da RT-qPCR (KUBISTA et al., 2006).

O valor de inclinação da reta obtido pela regressão linear de cada curva padrão gerada foi utilizado para se calcular a eficiência (E) de amplificação da qPCR, de acordo com a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação})}$$

Na RT-qPCR, a variação intra-ensaio foi avaliada com cada diluição viral da curva padrão testada em triplicata. O limite de detecção foi determinado como a menor quantidade de RNA padrão que pode ser detectado com 100% de probabilidade. A variação inter-ensaio na RT-qPCR foi determinada por três corridas independentes da curva padrão, em triplicada.

Após a padronização da técnica RT-qPCR e confirmação da sensibilidade analítica, as amostras de sangue total e fetos abortados e natimortos foram submetidas ao teste para a pesquisa do SBV.

4.2 AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO SBV NO BRASIL

Para verificar a circulação do SBV no Brasil, foram analisadas tanto amostras de sangue total com EDTA quanto amostras de pool de órgão de fetos abortados para pesquisa direta do SBV. Também foram analisadas amostras de soro para a pesquisa indireta do SBV.

4.2.1 Seleção das Amostras

4.2.1.1 Amostras de Sangue Total

Foram analisadas 1665 amostras de sangue total com EDTA de bovinos com idade de 0 a 12 meses. Dessas amostras, 543 foram coletadas em novembro de 2016 provenientes do município de Barretos (estado de São Paulo), 162 foram coletadas entre abril e maio de 2017 e 960 coletadas em junho de 2017, todas estas provenientes do município de Abaetetuba (estado do Pará). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Víruses de Bovídeos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, para certificação de rebanho para exportação e conservadas a -20°C até o momento da análise. Os animais analisados pertenciam a várias propriedades localizadas na região tanto de Barretos e arredores como de Abaetetuba e arredores, que foram agregados para somar e totalizar o número de animais que seria exportado no respectivo trâmite.

4.2.1.2 Amostras de Fetos Abortados

Foram analisadas retrospectivamente 313 amostras de fetos abortados e natimortos sendo 283 bovinos, 5 caprinos, 23 ovinos e 2 bubalinos, todas coletadas entre janeiro de 2011 a dezembro de 2018. Foram analisados pool de órgão desses fetos composto por SNC, coração, fígado, baço e rim. Quando coletadas, foram analisadas separadamente amostras de placenta e cordão umbilical.

Os fetos abortados estavam em diversos estágios gestacionais, incluindo natimortos ou óbitos logo após o nascimento. Foram provenientes de 255 propriedades de diversos estados brasileiros.

Essas amostras foram encaminhadas durante esses anos ao Laboratório de Víruses de Bovídeos e Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, por veterinários oficiais e autônomos que atuam no campo, para fins de diagnóstico diferencial de fetos

abortados e estavam conservadas a -20°C . Os dados das propriedades e rebanhos foram retirados das fichas de encaminhamento das amostras.

4.2.1.3 Amostras de Soro

A seleção das amostras de soro foi baseada em um estudo soroepidemiológico para avaliação de circulação viral em diversas partes dos estados do Amazonas e Pará (divisa com Amazonas) promovido pelo MAPA em 2014. A seleção teve como base os dados de mapa síntese das propriedades do município de Humaitá (estado do Amazonas), fornecidos pela ADAF (2018).

Foram analisadas 26 propriedades rurais do município de Humaitá, sendo que a seleção das propriedades ocorreu por meio de sorteio de cadastros, classificadas de acordo com o número de amostras, sendo 18 pequenas propriedades com 1 a 21 bovinos para amostragem, 5 médias propriedades com 22 a 65 bovinos para amostragem e 3 grandes propriedades com mais de 65 bovinos para amostragem (quadro 3).

No total foram analisadas 596 amostras de soro de fêmeas bovinas, tanto de corte da raça nelore como leiteiras da raça girolando e com idade de 13 a maiores de 36 meses (quadro 3). As amostras foram coletadas entre outubro de 2017 a março de 2018, encaminhadas ao Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo como parte de outro projeto de pesquisa sorológica e conservadas a -20°C até o momento da análise para SBV. As propriedades apresentavam rebanho misto, leiteiros e de corte (quadro 2) e definidas como agricultura familiar ou comercial de acordo com o Decreto Federal nº 9.064, de maio de 2017, baseado em módulos fiscais. Os dados estão na quadro 3.

Quadro 2: Número de animais amostrados por idade das fêmeas e tipo de aptidão do rebanho.

Idade das fêmeas amostradas	Aptidão			
	MISTO	LEITEIRO	CORTE	TOTAL
13 a 24 meses	9	6	128	143
25 a 36 meses	6	14	95	115
acima de 36 meses	13	26	299	338

Quadro 3: Classificação, espécies criadas, quantidade de animais, tipo, tamanho, idade e número de animais coletados de cada propriedade. ha: hectares.

Número da propriedade	Classificação da propriedade	Espécies na propriedade	Quantidade de animais no rebanho	Tipo de criação	Tamanho ha	Fêmeas de 13 a 24 meses	Fêmeas de 25 a 36 meses	Fêmeas com + de 36 meses	Total de Fêmeas
1	Pequena	Bovino	53	Familiar	128	2	1	3	6
2	Pequena	Bovino/Equino/Suíno	45	Familiar	96	1	1	4	6
3	Pequena	Bovino	50	Comercial	900	2	2	2	6
4	Pequena	Bovino	45	Familiar	44	1	1	3	5
5	Pequena	Bovino	87	Comercial	500	2	2	6	10
6	Pequena	Bovino/Equino	85	Familiar	88	3	2	4	9
7	Pequena	Bovino	50	Familiar	106	4	2	3	9
8	Pequena	Bovino	47	Familiar	300	1	2	6	9
9	Pequena	Bovino/Ovino/Equino/Suíno	87	Familiar	206	4	2	4	10
10	Pequena	Bovino/Equino/Suíno	82	Familiar	100	2	3	5	10
11	Pequena	Bovino/Equino	108	Familiar	156	2	3	6	11
12	Pequena	Bovino	78	Familiar	100	2	3	5	10
13	Pequena	Bovino	94	Familiar	250	3	4	5	12
14	Pequena	Bovino	97	Familiar	100	2	4	6	12
15	Pequena	Bovino/Equino	99	Familiar	300	2	4	6	12
16	Pequena	Bovino/Equino	94	Comercial	5000	3	4	6	13
17	Pequena	Bovino	116	Comercial	500	3	2	9	14
18	Pequena	Bovino/Equino/Suíno	127	Familiar	400	10	2	2	14
19	Média	Bovino/Ovino/Equino/Suíno	155	Comercial	1200	2	6	14	22
20	Média	Bovino	168	Comercial	1000	12	5	9	26
21	Média	Bovino/Equino/Suíno	388	Comercial	1000	13	12	7	32
22	Média	Bovino	259	Comercial	775	4	3	36	43
23	Média	Bovino/Equino	359	Comercial	4000	13	8	22	43
24	Grande	Bovino	468	Comercial	558	11	8	55	74
25	Grande	Bovino/Equino/Muar	543	Comercial	1250	23	14	51	88
26	Grande	Bovino/Caprino/Equino/Muar	740	Comercial	2300	16	15	59	90
Total						143	115	338	596

4.2.2 Diagnóstico Direto

Para a realização do diagnóstico direto, inicialmente foi padronizada e validada uma RT-qPCR (como já descrito anteriormente) e posteriormente foram testadas as amostras de sangue total e pool de órgãos dos fetos abortados e natimortos.

4.2.2.1 Extração Material Genético

A extração do material genético das amostras foi realizada em extrator automático QIAcube HT (Qiagen), utilizando o kit cador[®]Pathogen 96 QIAcube[®] HT Handbook (Qiagen) de acordo com recomendações do fabricante.

Após a extração, o ácido nucleico foi dosado por espectrofotometria (Biofotômetro Eppendorf[®]). Para uma extração válida, a razão entre as absorbâncias 260/280 deve estar entre 1.8 e 2.0 (SAMBROOK, 2001).

4.2.2.2 Detecção por RT-qPCR

A detecção do RNA do SBV foi realizada por RT-qPCR, padronizada e validada neste estudo, sendo que para amplificação utilizou-se o kit GoTaq[®] Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega), num volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix (2x); 0,4 µL GoScript[™] RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X); 700 nM do *primer forward*; 800 nM do *primer reverso*, 90 nM da sonda de hidrólise; 2 µL do RNA extraído e água *nuclease-free* q.s.p.. As condições de amplificação estão no quadro 4 e o equipamento utilizado foi Light Cycler 480 (Roche Molecular Systems).

Quadro 4: Condições de ciclagem e temperatura de amplificação RT-qPCR para SBV.

Transcrição Reversa						
Target (°C)	Acquisitionmode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	AnalysisMode
45	None	00:15:00	4.4		1	None
Desnaturação						
Target (°C)	Acquisitionmode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	AnalysisMode
95	None	00:02:00	4.4		1	None
Amplificação						
Target (°C)	Acquisitionmode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate(°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	AnalysisMode
95	None	00:00:15	4,4		40	Quantification
60	Single	00:01:00	2,2			
Resfriamento						
Target (°C)	Acquisitionmode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	AnalysisMode
40	None	00:00:10	1,5		1	None

4.2.2.3 Controle Interno da RT-qPCR

Para controle interno dos métodos moleculares de detecção do SBV foi realizada RT-qPCR do gene endógeno β - actina (região altamente conservada do genoma) para diminuir os possíveis falsos negativos decorrentes da não extração do material genético, degradação do RNA e por possíveis fatores de inibição da PCR presentes nas amostras analisadas. A reação e a sequência de *primers* e sonda de hidrólise foram recomendados pelo FLI (quadro 5). Todas as amostras deste estudo analisadas por métodos moleculares foram testadas para o gene da β -actina.

Quadro 5: Sequência dos *primers* e sonda de hidrólise e tamanho do amplificado do gene endógeno.

Nome	Sequência	Amplificado
ACT-1005F	5' CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C 3'	Aprox. 130 pb
ACT-1135R	5' CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T 3'	
ACT-1081HEX	5' HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T (ZEN-Iowa BQ) 3'	

A sonda de hidrólise foi conjugada ao 5- Hexachloro-Fluorescein (HEX emissão de comprimento de onda 556 nm) na extremidade 5' (*reporter*) e ZEN-IowaBQ (emissão comprimento de onda 555 nm) na extremidade 3' (duplo *quecher*).

Para a amplificação foi utilizado o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega), sendo que a RT-qPCR foi realizada num volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® ProbeqPCR Master Mix (2x); 0,4 µL GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X); 200 nM de ambos *primers*, 100 nM da sonda de hidrólise; 2 µL do RNA extraído e água *nuclease-free* q.s.p.. As condições de amplificação estão na tabela 6 e o equipamento utilizado foi Light Cycler 480 (Roche Molecular Systems).

Também, para avaliar inibidores de reação, todas as amostras negativas para o SBV foram contaminadas com o controle padrão de tal modo que a amostra ficasse com uma concentração final de 10³ cópias de RNA/µL e submetidas novamente a RT-qPCR. Comparou-se então o Cq da curva padrão 10³ cópias de RNA/µL com o Cq das amostras contaminadas e avaliou-se a variação dos Cq obtidos, assim como a não amplificação.

Além disso, foi testada a possibilidade da utilização de uma RT-qPCR em multiplex, para amplificação tanto do SBV como do gene endógeno em uma mesma reação e ao mesmo tempo. Para isso foram utilizados os *primers* e sonda de hidrólise dos quadros 1 e 5, sendo que a RT-qPCR em multiplex foi realizada num volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2x); 0,4 µL GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X); 700 nM do *primer forward* SBV; 800 nM do *primer reverso* SBV; 90 nM da sonda de hidrólise SBV; 200 nM de ambos *primers* do gene endógeno; 100 nM da sonda de hidrólise do gene endógeno; 2 µL do RNA extraído e água *nuclease-free* q.s.p. e as condições de ciclagem e temperatura que estão no quadro 4. Verificou-se a sensibilidade analítica da RT-qPCR em multiplex e comparou-se com as das reações realizadas separadamente, pela curva padrão testada em três reações realizadas em dias diferentes e em triplicata.

4.2.2.4 Diagnóstico Diferencial de Fetos Abortados

Nas amostras de pool de órgão de fetos abortados e natimortos, também foi realizado diagnóstico diferencial de fetos abortados por meio de métodos moleculares de detecção (PCR e qPCR) com protocolos padronizados e validados pelo Laboratório de Virose de Bovídeos e utilizados na rotina laboratorial para a detecção dos principais agentes virais que causam aborto, sendo eles Herpes Vírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e

Vírus da Língua Azul (BTV), como também *Neospora caninum*. Os resultados apresentados neste trabalho foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico.

Também foi realizado exame bacteriológico no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico em algumas dessas amostras, no qual são processados placenta, conteúdo gástrico e órgãos (fragmentos de rim, fígado, baço e pulmão) de fetos abortados, que são submetidos às técnicas bacteriológicas para isolamento e identificação de bactérias aeróbias (enterobactérias e cocos e bastonete gram-positivos) e microaerófilas (*Campylobacter* spp., *Brucella* spp., *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* e *Listeria monocytogenes*), segundo Songer e Post (2005), Scarcelli et al.(2004) e OIE (2012). Foram considerados como possíveis causas de abortamento os microrganismos isolados em cultura pura ou preponderantes. No mesmo laboratório também foi realizado PCR para *Leptospira* spp. de placenta, conteúdo gástrico e órgãos (fragmentos de rim, fígado, baço e pulmão) de fetos abortados processados segundo Scarcelli et. al (2004) sendo o teste da PCR para detecção de *Leptospira* spp. realizado de acordo com Merien et al. (1992). Todos resultados apresentados neste trabalho foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Doenças da Reprodução do Instituto Biológico.

4.2.3 Diagnóstico Indireto

Para pesquisa de anticorpo contra o SBV foi realizado o teste de ELISA indireto, utilizando o kit comercial ID Screen[®] Schmallenberg virus Indirect Multi-species (IDvet) de acordo com o manual do fabricante. Segundo informações do mesmo, a sensibilidade diagnóstica e a especificidade do kit ELISA são 97,72% e 99,67%, respectivamente. Os resultados foram expressos como porcentagem S/P (S/P%) utilizando as densidades óticas (DO) do leitor de ELISA ($S/P\% = DO_{\text{amostra}} / DO_{\text{controle positivo}} \times 100$). Um ponto de corte prescrito pelo fabricante foi usado para atribuir as amostras a uma categoria (positiva > 60%, negativa ≤ 50% e duvidosa > 50 e ≤ 60%). As amostras duvidosas foram repetidas em triplicatas.

Do total de amostras de soro analisadas, foram selecionadas aleatoriamente uma amostra de cada propriedade, totalizando 26 amostras, para detecção de anticorpos contra BTV. Foi realizado o teste ELISA competitivo utilizando o Kit comercial Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA v2 (VMRD), de acordo com o manual do fabricante. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição (% I) utilizando DO do leitor de ELISA ($\% I = 100$

[1- (DO da amostra ÷ DO controle negativo)]. Para validação do teste a média dos Controles Negativos (CN) deve produzir um sinal ótico densidade $> 0,300$ e < 2.000 e a média dos Controles Positivos deve ter uma inibição de $\geq 60\%$. Se uma amostra de teste produzir $\geq 60\%$ de inibição, é positiva. Se uma amostra de teste produzir $< 60\%$ de inibição, é negativa.

4.2.4 Análise Estatística

A amostragem deste estudo foi direcionada por um banco de conveniência. Porém, supondo-se que o SBV ocorra no Brasil e que sua prevalência seja de pelo menos 20% (prevalência essa abaixo das dos países onde já foi relatada sua ocorrência, segundo dados da literatura) e é desejada uma precisão absoluta de 5% com intervalo de confiança 95% (limites do intervalo associado de 95% de confiança são 15% e 25%), o tamanho aproximado de amostra necessário para estimar a prevalência do SBV em uma população de estudo considerada infinita (animais brasileiros) pode ser determinado por precisão e nível de confiança definidos, sendo que os limites do intervalo associado indicam as fronteiras dentro das quais a estimativa não será confiável com o nível de confiança definido (THRUSFIELD, 2004).

A fórmula para um intervalo de confiança de 95% é:

$$n = \frac{1,96^2 P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

Onde:

n = tamanho da amostra

P_{esp} = prevalência (proporção de infectados) esperada

d = erro (relacionado à precisão desejada).

5 RESULTADOS

Este é o primeiro relato da investigação da ocorrência do SBV no Brasil. Para isso inicialmente estabeleceu-se diagnóstico laboratorial molecular (RT-qPCR) e analisou-se amostras de sangue total e pool de órgãos de fetos abortados para pesquisa do agente (RNA do SBV). Posteriormente, analisou-se amostras de soro para a pesquisa de anticorpo anti-SBV.

5.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA RT-qPCR PARA DETECÇÃO DO SBV

Para a pesquisa direta do SBV, inicialmente foi padronizada e validada uma RT-qPCR para detecção do RNA viral.

5.1.1 Desenvolvimento Controle Positivo

Foi possível o desenvolvimento do controle positivo sintético gBlocks® (sequência gênica de DNA linear de cadeia dupla) inócuo e não infectante cujo desenho encontra-se na figura 7.

Figura 7: Sequência de nucleotídeos do gBlocks® (823 pb) desenhado para o desenvolvimento do controle positivo padrão para os métodos moleculares de detecção do SBV.

```

EcoRI
5' - TTT TTG AAT TCA GAA ATA TGT CAA GCC AAT TCA TTT TTG AAG ATG TAC CAC AAC GGA ATG CAG CTA CAT
TTA ACC CGG AGG TCG GGT ATG TGG CAT TTA TTG GTA AGT ATG GGC AAC AAC TCA ACT TCG GTG TTG CTA GAG
TCT TCT TCC TCA ACC AGA AGA AGG CCA AGA TGG TCC TAC ATA AGA CGG CAC AAC CAA GTG TCG ATC TTA CTT
TTG GTG GGG TCA AAT TTA CAG TGG TTA ATA ACC ATT TTC CCC AAT ATG TCT CAA ATC CTG TGC CAG ACA ATG
CCA TTA CAC TTC ACA GGA TGT CAG GAT ATC TAG CAC GTT GGA TTG CTG ATA CAT GCA AGG CTA GTG TCC TCA
AAC TAG CTG AAG CTA GTG CTC AGA TTG TCA TGC CCC TTG CTG AGG TTA AGG GAT GCA CCT GGG CCG ATG GTT
ATA CAA TGT ATC TTG GAT TTG CAC CTG GGG CCG AAA TGT TCC TTG ATG CTT TTG ACT TCT ATC CAC TAG TTA
TTG AAA TGC ATA GGG TCC TCA AGG ACA ATA TGG ATG TAA ATT TTA TGA AAA AAG TCC TCC GCC AAC GCT ATG
GAA CAA TGA CTG CTG AAG AAT GGA TGA CTC AGA AAA TAA CAG AAA TAA AAG CTG CTT TTA ATT CTG TTG GAC
AGC TTG CCT GGG CCA AAT CTG GAT TCT CTC CTG CTG CTA GAA CCT TCT TGC AGC AAT TCG GTA TCA ACA TCT
AAA CCT CTT CAT CAC AGA TCT TCA ATT TCC GTG CAA TAT GTC TAT GTA TTG CAC ACC ATT ATA CTG CAA GGC
TTC TGT TAA GAT AGT TAA TAA GTG GAT CCT TTT T -3'
BamHI

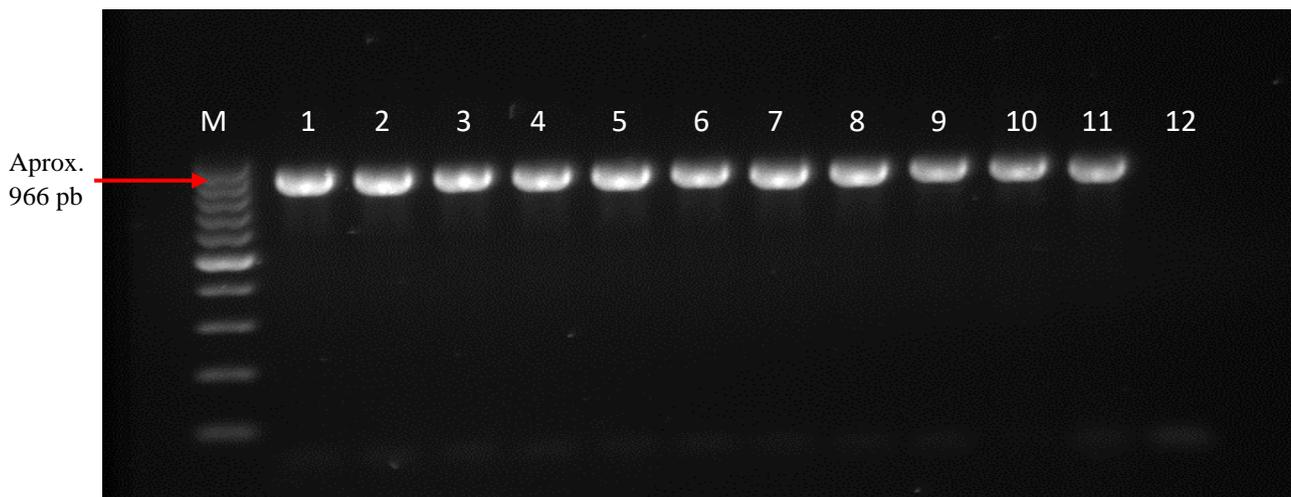
```

Essa sequência contempla a região do segmento S do genoma do SBV. Após seu desenho, a sequência do gBlock® foi analisada no Bioedit frente a todas as sequências do segmento S do genoma do SBV depositadas no GenBank, que eram aproximadamente 114 até o momento da análise, e obteve-se uma identidade de 99 a 100% entre todas as sequências analisadas.

Posteriormente, foi possível a clonagem do gBlock® utilizando como vetor o plasmídeo pTZ57R/T e a bactéria *E. coli* cepa JM109 para propagação dos vetores recombinantes.

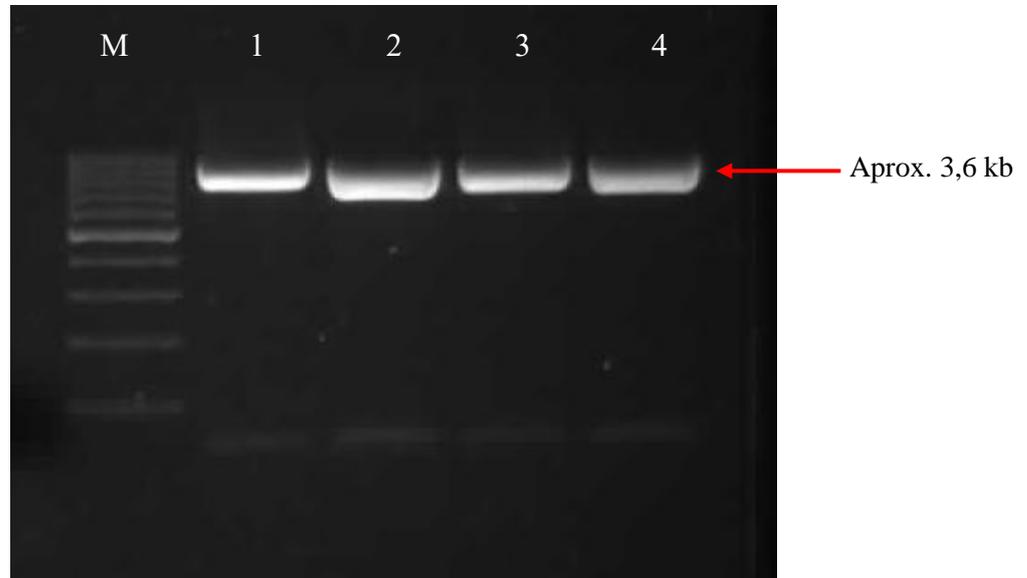
O sequenciamento dos plasmídeos recombinantes (colônias brancas) assim como a PCR, cujos produtos estão na figura 8, ambos utilizando os *primers* M13, confirmou a ligação e orientação correta do inserto com o vetor. Alinhando-se o sequenciamento dos plasmídeos recombinantes com a sequência do gBlock[®], o valor de identidade da sequência de nucleotídeos foi de 100% indicando a conservação e o sucesso da clonagem do fragmento.

Figura 8: PCR das colônias brancas com o *primer* M13. M: marcador de tamanho molecular 100 pb; colunas 1 ao 11: reações positivas com banda na altura esperada de aproximadamente 966 pb; coluna 12: controle negativo.



O sucesso da digestão dos plasmídeos recombinantes utilizando a enzima de restrição *EcoRI* pode ser visualizado na figura 9, onde observa-se a linearização do plasmídeo (tamanho de 2847 pb) juntamente com o inserto (tamanho de aproximadamente 813 pb) formando um único fragmento específico e esperado de aproximadamente 3660 pb.

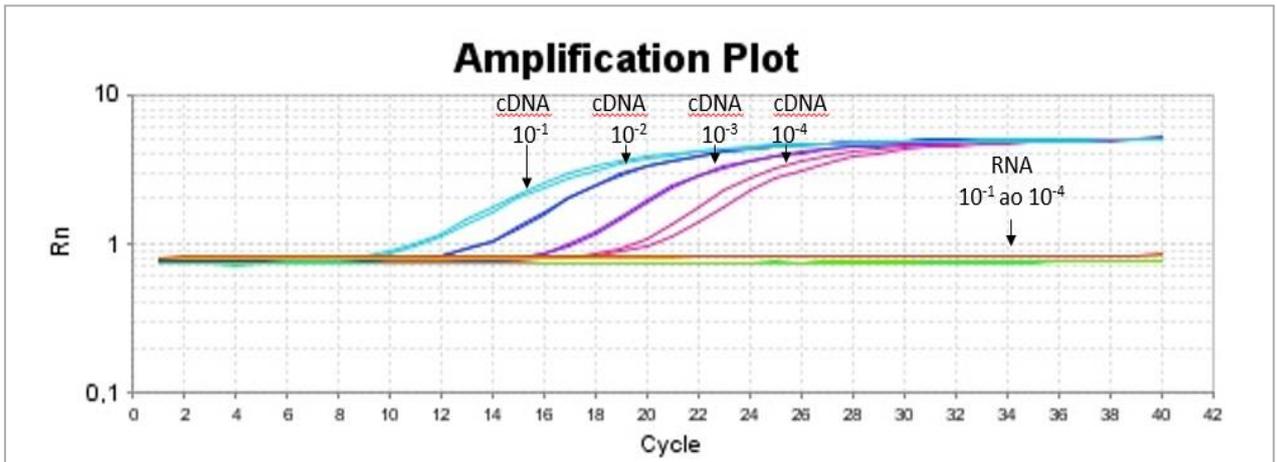
Figura 9: Digestão dos plasmídeos recombinantes com a enzima *EcoRI*. M: marcador de tamanho molecular 1kb; colunas 1 a 4 plasmídeo linear digerido com banda que corresponde ao tamanho do plasmídeo pTZ57R/T de 2847 pb mais o inserto de 813 pb.



O produto dos plasmídeos recombinantes digeridos e purificados foram submetidos a transcrição *in vitro* para a obtenção do RNA e para a degradação do DNA residual o mesmo foi tratado com DNase. Para verificar a total degradação do DNA residual foi realizada qPCR utilizando como alvo tanto o RNA tratado com DNase como também o RNA tratado com DNase transcrito em cDNA, ambos diluídos de 10^{-1} a 10^{-4} para verificar inibidores.

Como observa-se na figura 10, houve total degradação do DNA residual pela ação da enzima DNase, como também integridade do RNA, pois não houve amplificação quando o alvo era apenas RNA e houve amplificação quando o alvo era cDNA, em todas as diluições, o que demonstra também ausência de inibidores.

Figura 10: Curva de amplificação qPCR do controle de qualidade da degradação do DNA residual e integridade do RNA. Diluições do 10^{-1} ao 10^{-4} tanto do cDNA como do RNA, todos em duplicata. Rn: fluorescência do corante repórter dividida pela fluorescência de um corante de referência passivo.



Isso garantiu a confiabilidade do uso desse controle, o qual apresenta apenas RNA do SBV, na padronização e construção da curva padrão na PCR quantitativa e quantificação das amostras na detecção direta do SBV.

O RNA sem DNA residual, tido como vírus padrão neste estudo, foi então quantificado e apresentou uma concentração de 43,45 ng/ μ L, o equivalente a $2,1 \times 10^{10}$ cópias de RNA/ μ L. A partir desta solução, foi feita uma diluição inicial 1:2 obtendo a concentração de $1,05 \times 10^{10}$ cópias de RNA/ μ L. A partir desta, foram feitas dez diluições em série na base 10, obtendo-se a concentração de RNA conforme a tabela 3.

Tabela 3: Número de cópias de RNA por microlitro das diluições do vírus padrão empregadas na padronização e curva padrão da RT-qPCR para detecção direta do SBV.

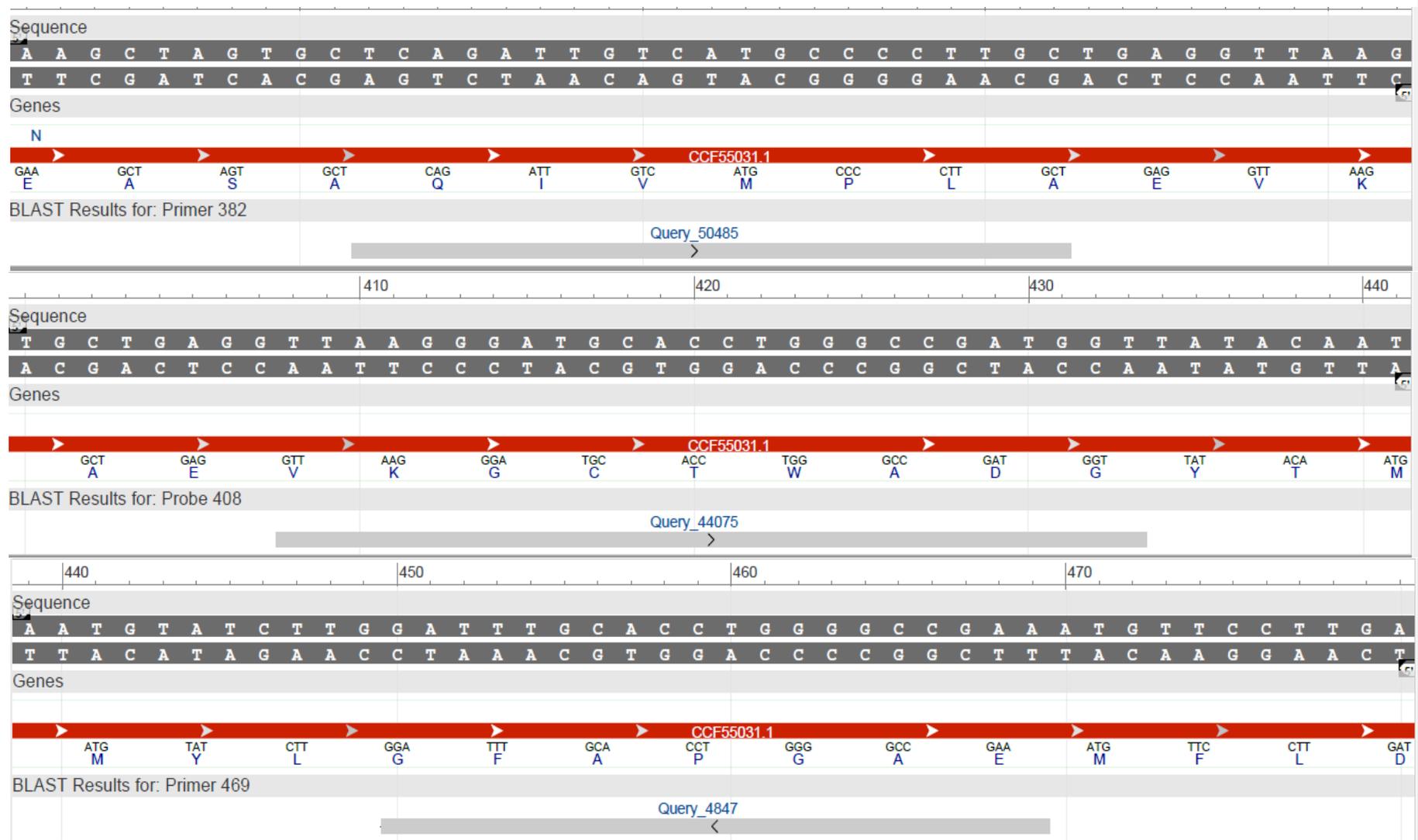
Diluição	Concentração	Cópias de RNA/μL
10⁻¹	10 ⁹	1000000000
10⁻²	10 ⁸	100000000
10⁻³	10 ⁷	10000000
10⁻⁴	10 ⁶	1000000
10⁻⁵	10 ⁵	100000
10⁻⁶	10 ⁴	10000
10⁻⁷	10 ³	1000
10⁻⁸	10 ²	100
10⁻⁹	10 ¹	10
10⁻¹⁰	10 ⁰	1

Essas diluições foram feitas inicialmente em água *nuclease-free* e utilizadas para padronização e construção da curva padrão da RT-qPCR. Posteriormente, essas diluições foram feitas em extraídos de pool de órgãos de fetos abortados como também em extraídos de sangue total sabidamente negativos para SBV e submetidas a RT-qPCR padronizada e não se observou a presença de inibidores ou algum outro fator que inibisse ou diminuísse a sensibilidade e especificidade analítica da RT-qPCR.

5.1.2 Padronização e Validação da RT-qPCR

Os *primers* e sonda de hidrólise utilizados neste estudo foram descritos por Hoffman et al (2012). Tanto a sequência dos *primers* quanto da sonda de hidrólise foram analisadas no BLAST e obtiveram 100% de identidade e *Query Cover* com as sequências do segmento S do genoma do SBV, como também baixa porcentagem de identidade e valor de *Query cover* com outras sequências alheias, incluindo o vírus Shamonda, indicando a alta especificidade tanto dos *primers* como da sonda de hidrólise. Na figura 11 ilustra-se a região de hibridação dos *primers* e da sonda de hidrólise referente ao *strain* BH80/11-4, número de acesso no GenBank HE649914.1, que foi utilizado como base no desenho do gBlock[®].

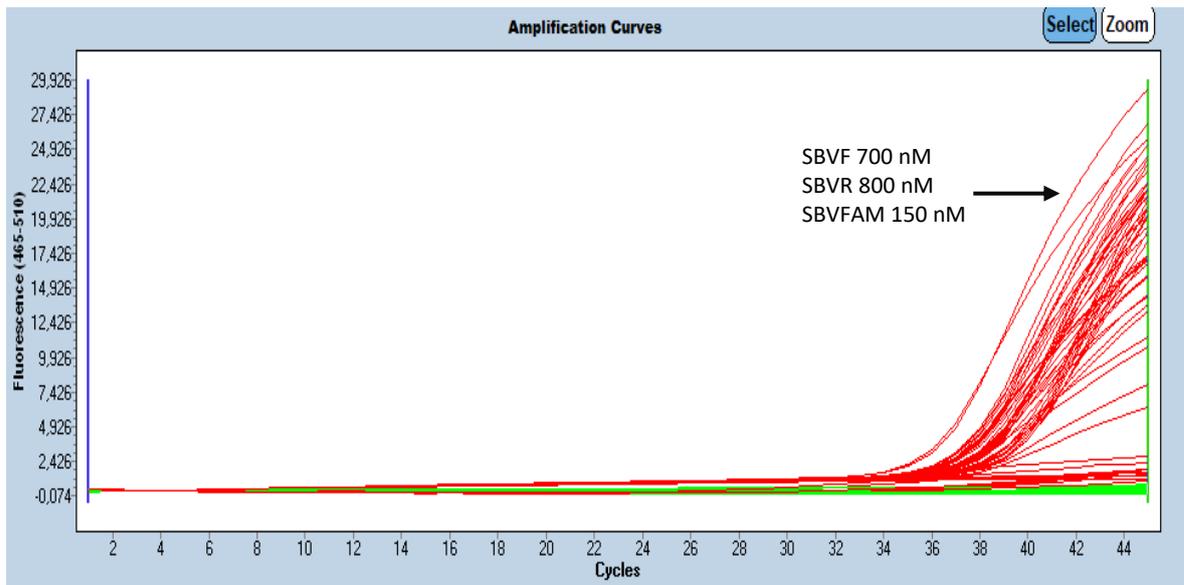
Figura 11: Região de hibridação dos *primers* e da sonda de hidrólise referente ao *strain* BH80/11-4, número de acesso no GenBank HE649914.1.



Foi padronizada e validada a RT-qPCR para detecção direta do SBV. Para isso, foram feitos vários ajustes tanto na programação como nas condições de reação.

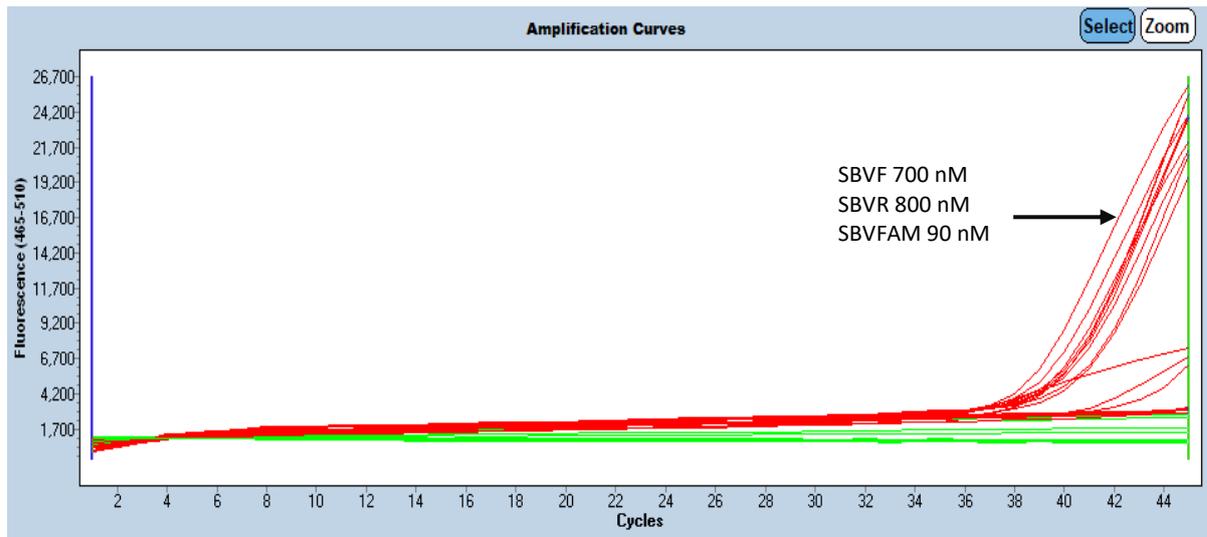
Inicialmente foi realizado um gradiente de concentração dos *primers*, conforme tabela 1 e obteve-se a melhor concentração do *primer forward* SBV-S-382F de 700nM e do *primer reverse* SBV-S-469R de 800nM, como observa-se na figura 12.

Figura 12: Gradiente de concentração dos *primers forward* e *reverse* com concentração de RNA viral de 10^3 cópias de RNA/ μ L.



Posteriormente, foram testadas as duas melhores concentrações dos *primers* (700/800 e 800/400 nM) em conjunto com gradiente de concentração da sonda de hidrólise (de 90 a 190 nM), confirmando que a concentração mais eficiente do *primer forward* é de 700 nM e do *reverse* é de 800 nM e obtendo melhor concentração da sonda de hidrólise de 90 nM, como observa-se na figura 13.

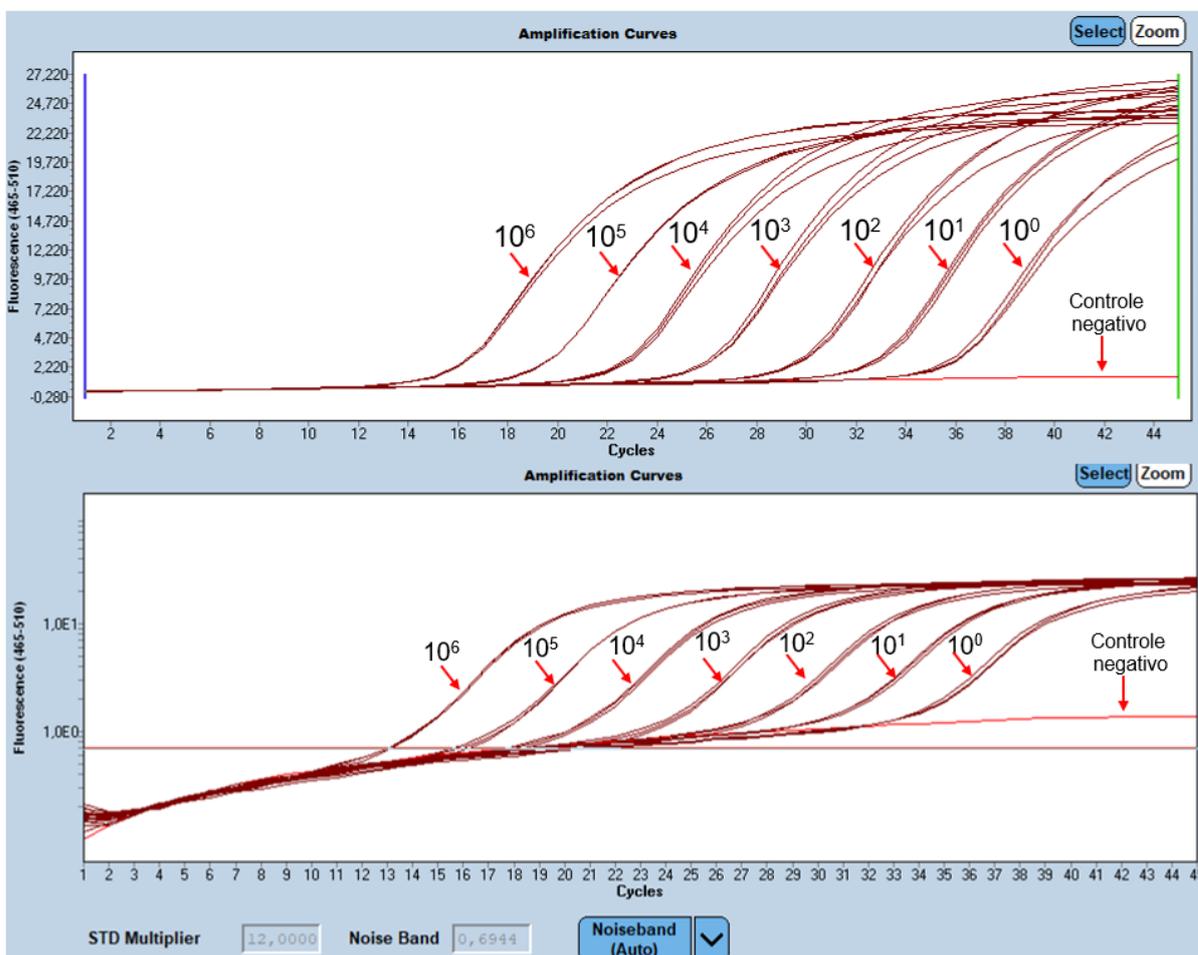
Figura 13: Gradiente de concentração dos *primers forward e reverse* em conjunto com a sonda de hidrólise e com concentração de RNA viral de 10^3 cópias de RNA/ μ L.



Após a determinação das melhores concentrações dos *primers* e sonda de hidrólise e condições de reação, avaliou-se a sensibilidade analítica da prova. Para isso submeteram-se as diluições do vírus tido como padrão neste estudo, inicialmente diluídos em água *nuclease-free* e posteriormente em extraídos de pool de fetos e sangue total, sabidamente negativos para SBV.

Na figura 14 e 15 observa-se a curva padrão da RT-qPCR para a detecção direta e quantificação do SBV e os valores da reação.

Figura 14: Curvas de amplificação das diluições do vírus padrão nas concentrações 10^6 a 10^0 cópias de RNA/ μ L.



Para a construção da curva padrão, foram feitos 7 pontos na curva que contemplaram Cq de aproximadamente 15 a 36 (tabela 4).

A sensibilidade analítica da reação foi de 1 cópia de RNA por microlitro (limite de detecção, com Cq de aproximadamente 36), ou seja, a última diluição em triplicata na qual obteve-se resultado positivo (tabela 4). Ressalta-se que os valores de *Threshold* (Noise Band) foram baixos, indicando pouco ruído de fundo, e variou de forma aceitável entre as reações.

Figura 15: Curva padrão RT-qPCR para SBV, concentrações 10^6 a 10^0 cópias de RNA/ μ L. Valores da reação: Erro= 0,01; Eficiência=1,98; *Slope*= -3,365.

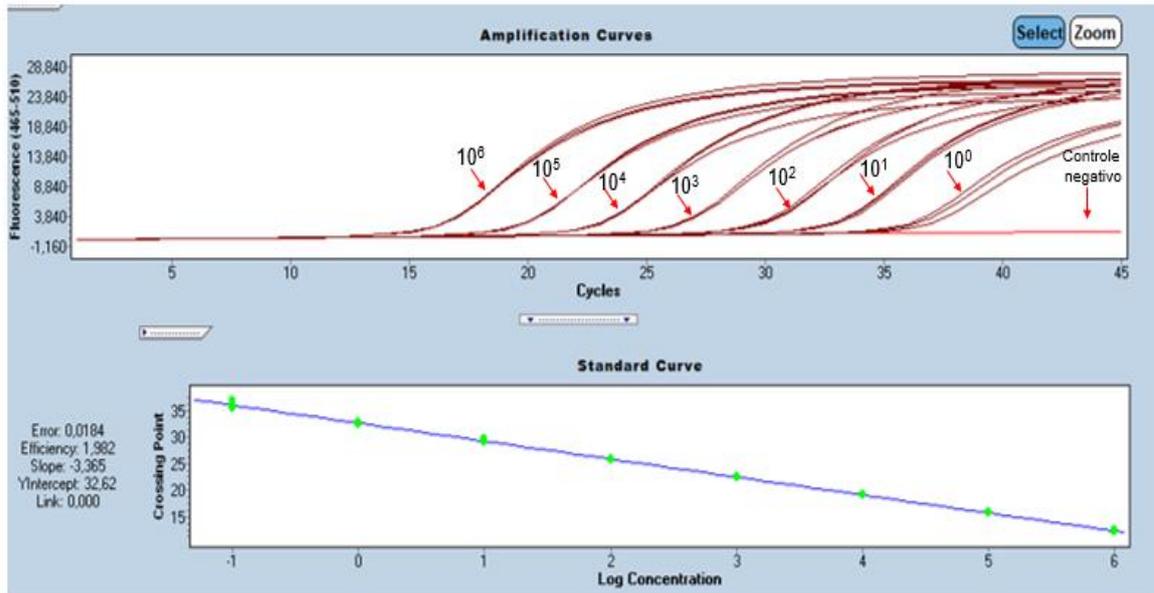


Tabela 4: Diluições do RNA padrão, média do Cq de cada diluição e concentração do RNA por microlitro em cada diluição.

Diluição RNA padrão	Média do Cq	Cópias de RNA/ μ L
10^{-4}	15,66	1000000
10^{-5}	19,00	100000
10^{-6}	22,34	10000
10^{-7}	25,80	1000
10^{-8}	29,14	100
10^{-9}	32,56	10
10^{-10}	35,99	1

Vale lembrar que as reações foram realizadas em triplicata e replicadas em três dias diferentes e obteve-se os mesmos resultados, como também não houve variação dos resultados entre as diluições realizadas em água *nuclease-free* e as realizadas em extraídos de pool de órgãos de fetos abortados e sangue total sabidamente negativos para SBV, indicando a ausência de fatores de inibição, precisão e confiabilidade da técnica.

5.2 AVALIAÇÃO DA CIRCULÇÃO DO SBV NO BRASIL

Para a avaliação da ocorrência e circulação do SBV no Brasil, foram analisadas 1665 amostras de sangue total bovino, 313 amostras de pool de órgão de fetos abortados e natimortos (bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos) para pesquisa direta do SBV e 596 amostras de soro bovino para a pesquisa indireta do SBV. Todas essas amostras pertenciam ao banco de conveniência do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico. Na figura 16 está a distribuição espacial das amostras analisadas.

Figura 16: Distribuição espacial das amostras de sangue total, fetos abortados e soro analisadas. A inclusão mostra detalhes da área onde as amostras de soro foram coletadas. Mapa criado pelo Google Maps.



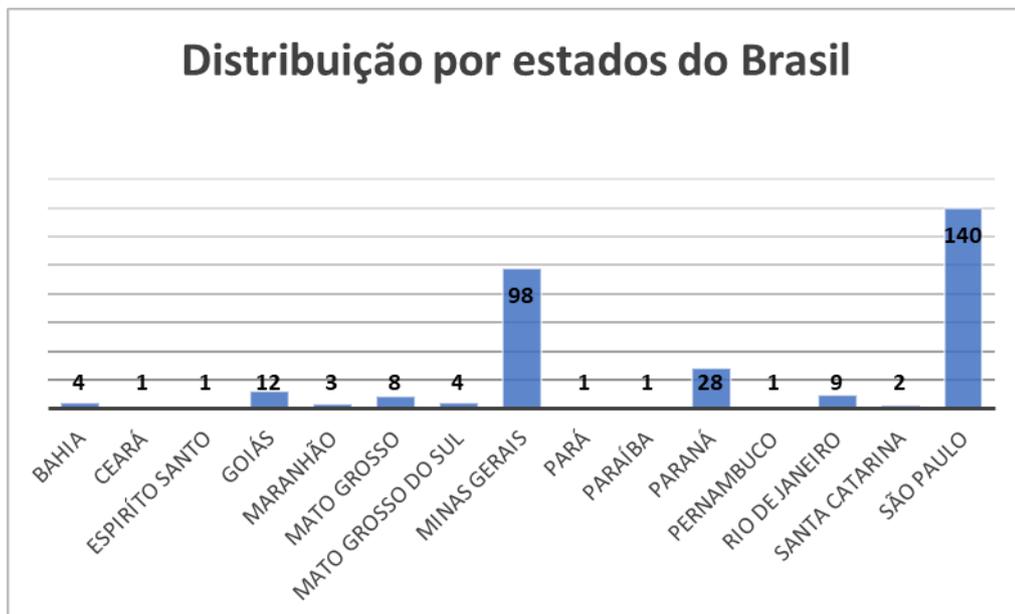
5.2.1 Pesquisa RNA do SBV por RT-qPCR

De todas as amostras de sangue total analisadas, nenhuma foi positiva para o SBV pela RT-qPCR (0/1665).

De todas as amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos analisadas, nenhuma foi positiva para o SBV pela RT-qPCR (0/313).

A seguir, encontram-se os dados das amostras, propriedades e rebanhos, retirados das fichas de encaminhamento das amostras de fetos abortados. Na figura 17 encontra-se a distribuição por estados brasileiros das 313 amostras de pool de órgãos analisadas e na figura 18 a distribuição das espécies animais analisadas.

Figura 17: Distribuição por estados do Brasil das amostras de pool de órgãos analisadas.



Das 313 amostras analisadas retrospectivamente, 283 eram de fetos bovinos, 2 eram bubalinos, 5 eram caprinos e 23 eram ovinos (figura 18). Todas essas amostras foram coletadas entre janeiro de 2011 a dezembro de 2018, sendo que 41 foram coletados em 2011, 26 em 2012, 57 em 2013, 25 em 2014, 32 em 2015, 53 em 2016, 37 em 2017 e 42 em 2018 (figura 19).

Figura 18: Contagem do número de espécies analisadas dos fetos abortados e natimortos.

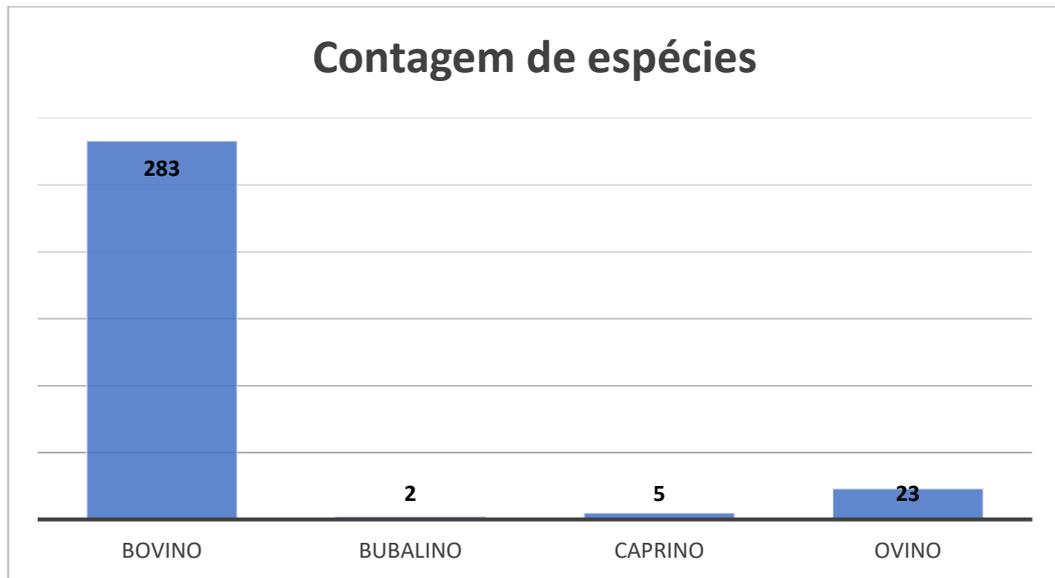
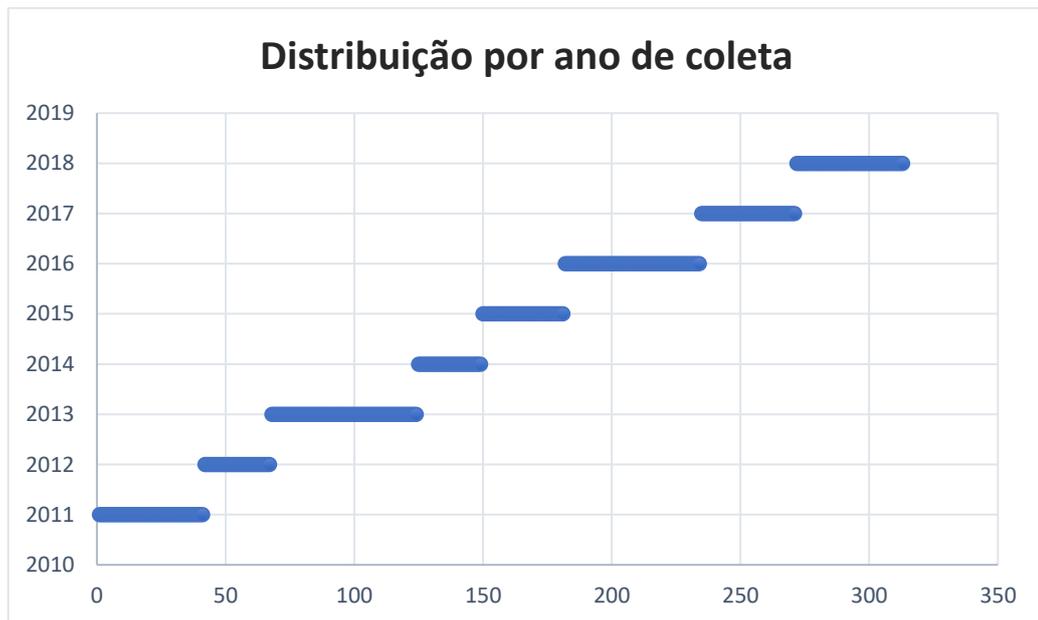


Figura 19: Distribuição das amostras de órgãos de fetos abortados e natimortos por ano de coleta.



A idade das mães dos fetos variou desde <36 meses até 9 anos (figura 20). Os fetos estavam em diversos estágios gestacionais, desde terço inicial, médio e final de gestação até natimortos ou mortos após alguns dias de nascimento (figura 21).

Figura 20: Idades das mães dos fetos abortados e natimortos. NI: não informado.

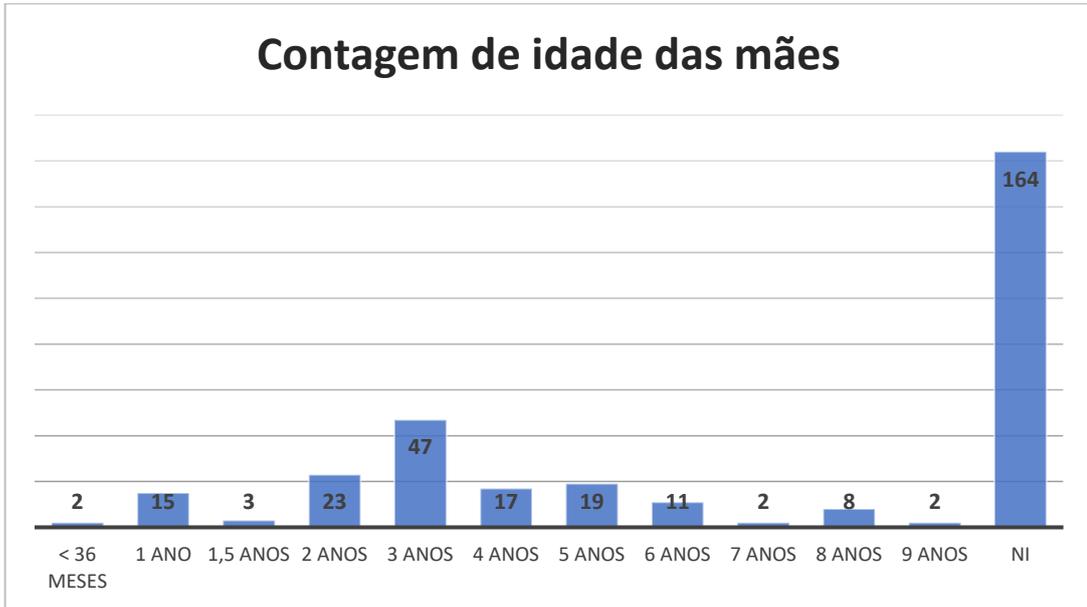
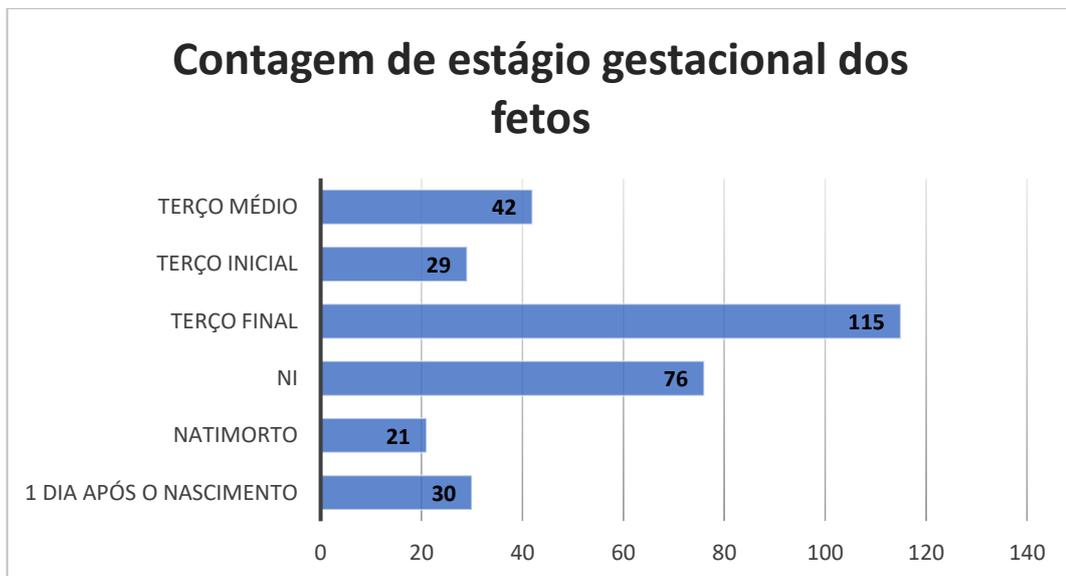
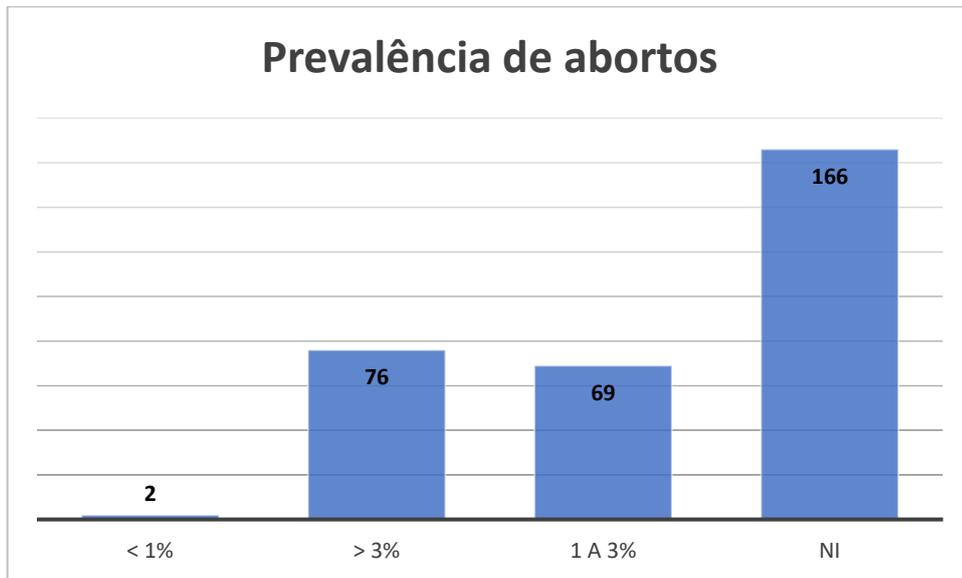


Figura 21: Estágio gestacional dos fetos analisados. NI: não informado.



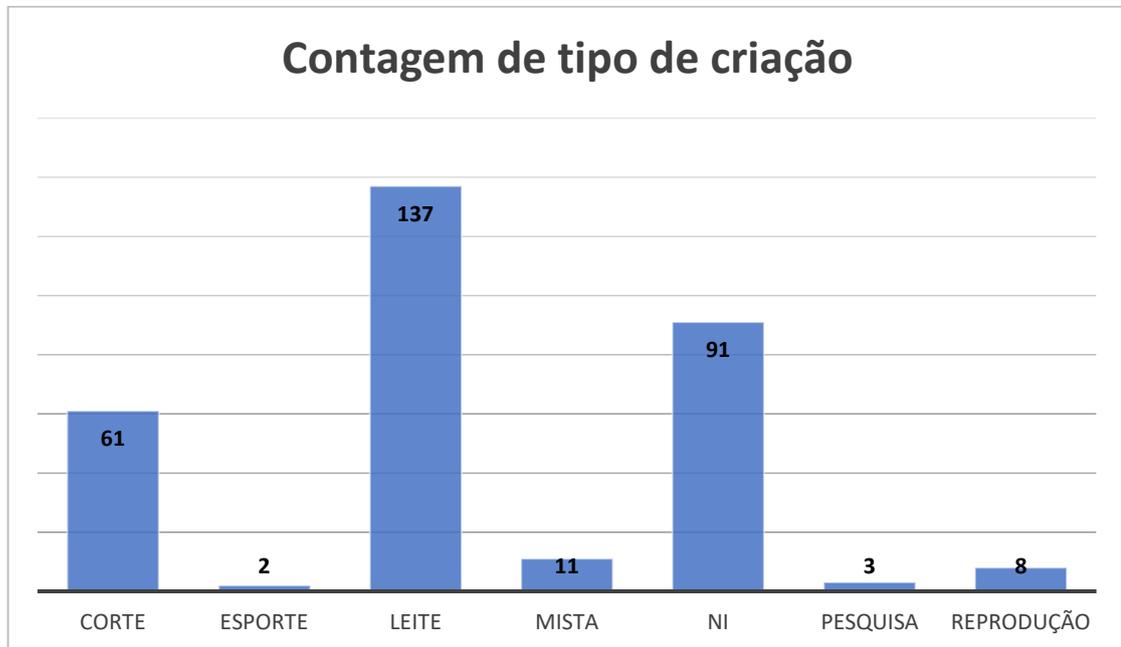
Na figura 22 está a prevalência de aborto das propriedades provenientes das amostras de fetos.

Figura 22: Prevalência de aborto nas propriedades das amostras de fetos analisadas. NI: não informado.



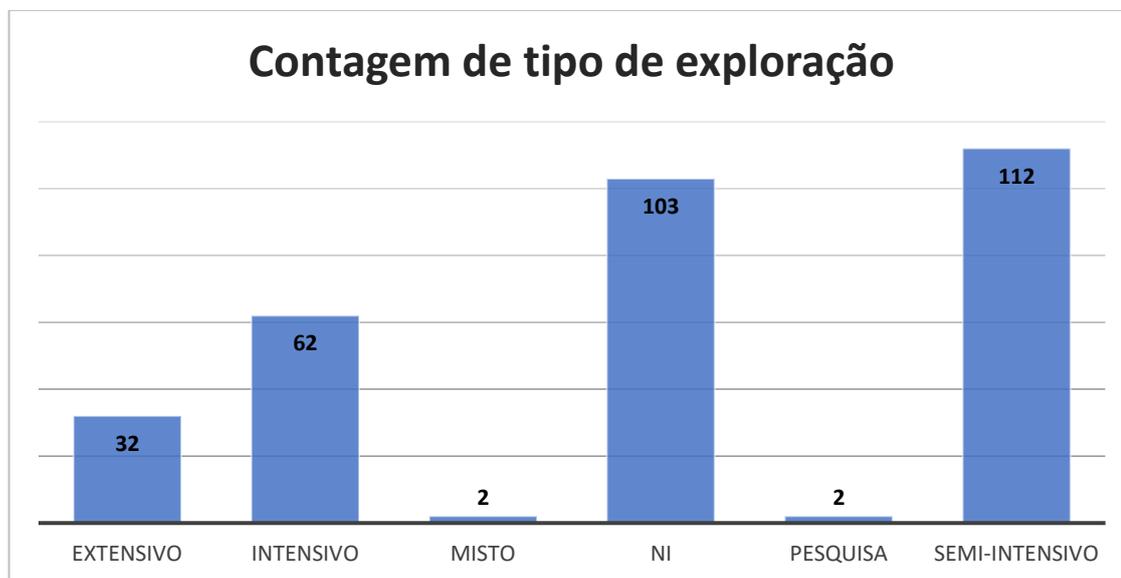
Na figura 23 está a distribuição por tipo de criação das propriedades as quais as amostras pertenciam, sendo que a grande maioria eram bovinos de leite.

Figura 23: Distribuição por tipo de criação das amostras de pool de órgãos analisadas. NI: não informada.



Na figura 24 está a distribuição por tipo de exploração das propriedades provenientes das amostras de pool de órgãos analisadas.

Figura 24: Distribuição por tipo de exploração das propriedades provenientes amostras de pool de órgão analisadas. NI: não informada.



A grande maioria dos rebanhos eram vacinados para Brucelose, Raiva, Leptospirose, Febre Aftosa, Carbúnculo, BVD, Botulismo, Clostridioses e IBR.

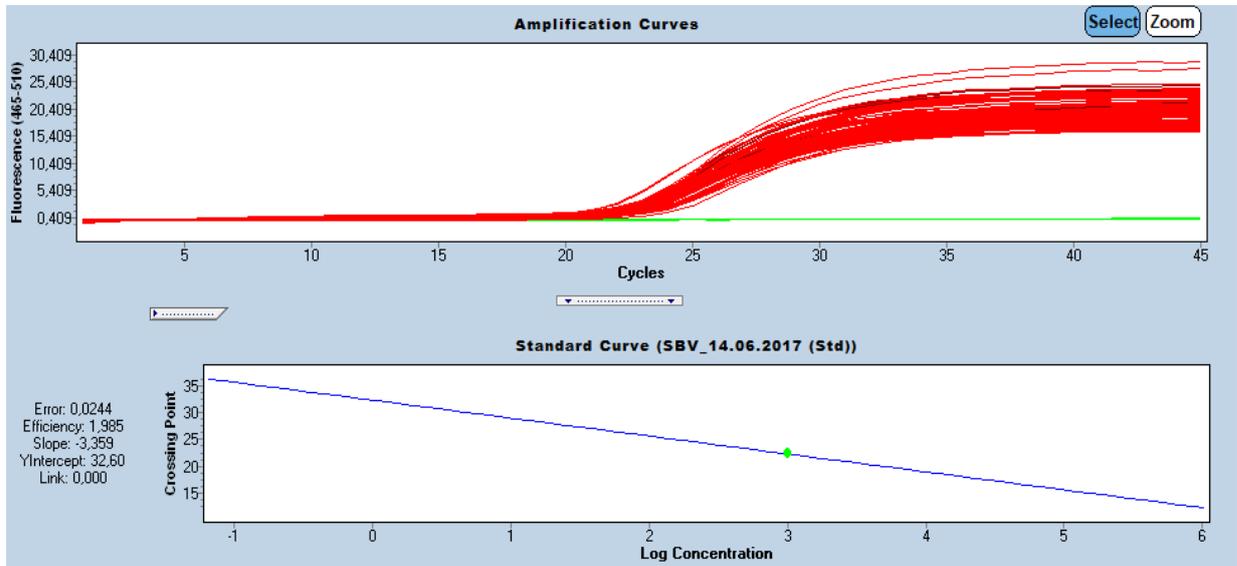
5.2.1.1 Controle Interno da RT-qPCR

Todas as amostras foram testadas para o gene da β - actina como também as que foram negativas para o SBV foram contaminadas manualmente com o controle padrão a uma concentração final de 10^3 cópias de RNA/ μ L, para avaliação de inibidores e eficiência da extração.

Todas foram positivas para o gene da β - actina e com Cq baixos, indicando uma extração eficiente (uma vez que a quantidade de RNA foi alta) e ausência de inibidores na reação.

Todas as amostras contaminadas foram positivas e não houve variações significativas do Cq indicando robustez, acuidade e precisão da RT-qPCR como também a ausência de inibidores na reação. Todas as amostras apresentarem resultados semelhantes aos mostrados na figura 25.

Figura 25: Amplificação das amostras negativas contaminadas com SBV 10^3 cópias de RNA/ μ L. Cq de aproximadamente 24. Valores da reação: Erro= 0,02; Eficiência= 1,98; *Slope*= -3,359

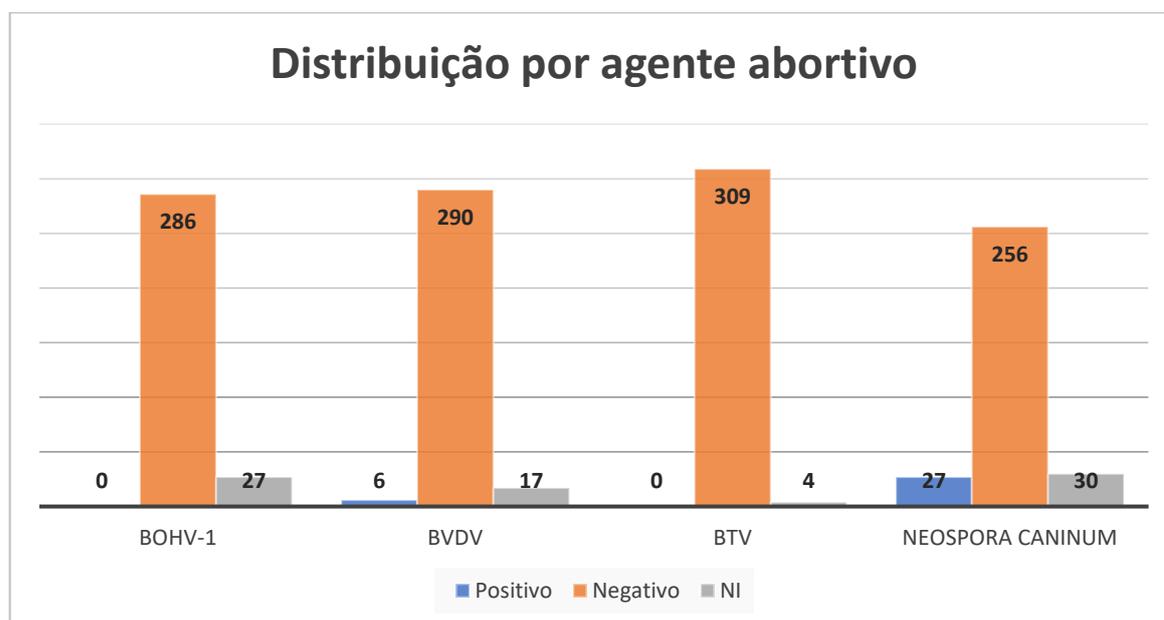


5.2.2 Diagnóstico Diferencial de Fetos Abortados

Além de serem testadas para SBV, também foi realizado diagnóstico molecular nas amostras de fetos abortados e natimortos para os principais agentes virais que causam aborto: Herpes Vírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Vírus da Língua Azul (BTV), como também *Neospora caninum*. Os resultados presentes na tabela 5 e na figura 26 foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico.

Tabela 5: Resultado do exame virológico e de *Neospora caninum* das amostras de pool de órgãos pela técnica de PCR. NI: não informado

Agente	Positivo	Negativo	NI
BoHV-1	0	286	27
BVDV	6	290	17
BTV	0	309	4
<i>Neospora caninum</i>	27	256	30

Figura 26: Distribuição por agente abortivo das amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos

Das 313 amostras de pool de órgão de fetos abortados e natimortos analisadas, foi realizado exame bacteriológico em 161 amostras. Os resultados apresentados na tabela 6 foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico.

Tabela 6: Resultado exame bacteriológico das amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos.

Agente	Número de animais
<i>Acinetobacter spp</i>	01
<i>Actinobacillus spp</i>	01
<i>Alcaligenes faecalis</i>	01
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	01
<i>Campylobacter fetus sub sp venerealis</i>	01
<i>Enterococcus faecalis</i>	01
<i>Escherichia coli</i>	18
<i>Klebsiella spp</i>	01
<i>Pseudomonas spp</i>	01
<i>Staphylococcus aureus</i>	07
<i>Streptococcus spp. (beta hemolítico)</i>	05
<i>Trueperella pyogenes</i>	01
Negativo	122
Total	161

Também, do total de amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos, 146 foram testadas para *Leptospira* sp sendo que todas foram negativas, resultado também cedido gentilmente pelo Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico.

5.2.3 Pesquisa de anticorpos anti- SBV por ELISA

Do total de amostras de soro de vacas leiteiras e de corte com idades entre 13 e maiores de 36 meses analisadas provenientes de 26 propriedades do município de Humaitá/ AM, nenhuma foi reagente para anticorpo anti-SBV (0/596).

Das amostras de soro que foram selecionadas aleatoriamente, sendo uma amostra de cada propriedade totalizando 26, para pesquisas de anticorpo contra BTV, todas foram reagentes para BTV (26/26), conforme tabela 7.

Tabela 7: Densidade ótica (DO) e porcentagem de inibição (%I) de cada amostra analisada para BTV.

Número da propriedade	DO	%I
1	0,104	84,11585
2	0,174	73,53659
3	0,173	73,6128
4	0,101	84,64939
5	0,163	75,15244
6	0,140	78,68902
7	0,124	81,03659
8	0,171	73,94817
9	0,173	73,6128
10	0,175	73,32317
11	0,163	75,16768
12	0,154	76,50915
13	0,176	73,17073
14	0,162	75,30488
15	0,100	84,7561
16	0,134	79,57317
17	0,124	81,09756
18	0,102	84,45122
19	0,100	84,7561
20	0,142	78,35366
21	0,123	81,25
22	0,152	76,82927
23	0,145	77,89634
24	0,161	75,45732
25	0,104	84,14634
26	0,121	81,55488

5.2.4 Análise Estatística

Supondo-se que o SBV ocorra no Brasil e que sua prevalência seja de pelo menos 20% (valor esse menor do que evidências anteriores na Europa) e é desejada uma precisão absoluta de 5% com intervalo de confiança 95% (limites do intervalo associado de 95% de confiança são 15% e 25%) foi calculado o tamanho aproximado de amostra (246 animais) necessário para estimar a prevalência do SBV em uma população de estudo considerada infinita (animais brasileiros) utilizando a fórmula:

$$n = \frac{1,96^2 P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

Logo:

$$n = \frac{1,96^2 0,2(1 - 0,2)}{0,05^2}$$

Ou seja, se o SBV fosse endêmico no Brasil, apesar das amostras analisadas neste estudo pertencerem a um banco de conveniência, com os tamanhos de amostras (sangue, feto abortado e soro), possivelmente 1 animal positivo seria detectado.

6 DISCUSSÃO

O uso de sequências de nucleotídeos sintéticas para controle positivo em técnicas moleculares de diagnóstico já é conhecido. Neste estudo, tanto o desenho como a clonagem da sequência sintética, mimetizando o segmento S do genoma do SBV (830 nucleotídeos) altamente conservada e utilizando como vetor o plasmídeo pTZ57R/T e *E. coli* como propagador dos vetores recombinantes, foi realizada com sucesso, possibilitando assim o desenvolvimento de um controle positivo inócuo e não infectante (representando nenhum risco biológico) o que possibilitou a padronização validação da RT-qPCR na detecção do SBV e implementação de tal método para pesquisa, diagnóstico e monitoramento do mesmo no Brasil.

Foi utilizado como referência para o desenho da sequência sintética a cepa BH80/11-4, número de acesso no GenBank HE649914.1, o qual foi sequenciado por Hoffmann e colaboradores em 2012 num estudo realizado no Instituto Friedrich-Loeffler (FLI), na Alemanha, pioneiro nos estudos sobre SBV, o qual diagnosticou e descreveu, por uma abordagem metagenômica e pela primeira vez, a ocorrência do SBV como também realizou o desenho dos *primers* e sonda de hidrólise utilizados nos estudos posteriores relacionados ao SBV.

Pelos altos valores de identidade e *Query cover* da sequência sintética frente a todas as sequências do segmento S do genoma do SBV depositadas no GenBank até o momento da análise, demonstra-se a representatividade dos SBVs circulantes no mundo e a confiabilidade do uso desta sequência no diagnóstico molecular do SBV no Brasil.

A qPCR tem sido muito utilizada nos últimos anos, por ser um teste rápido e de alta sensibilidade e especificidade, pois possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nos quais os micro-organismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou até mesmo em amostras altamente diluídos (BHUDEVI, WEINSTOCK, 2001).

Neste estudo foi padronizada e validada uma RT-qPCR para apoio na vigilância sanitária e rápida detecção numa eventual entrada do SBV no Brasil. Além disso, preparar os laboratórios de apoio ao MAPA para realizar este método para atender protocolos de exportação, para certificação de animais e material genético aos países importadores e assim manter aberto o mercado para países que impõem barreiras.

Para isso foram utilizados tanto os *primers* como a sonda de hidrólise descritos por Hoffman e colaboradores em 2012, os quais estão sendo utilizados na grande maioria dos estudos moleculares do SBV no mundo, assim como na rotina de laboratórios europeus de

referência (como o FLI) no diagnóstico molecular e monitoramento do SBV. Foi eleito o uso desses também pelo alto grau de identidade assim como valores apropriados de outros parâmetros (*score*, *query cover* e *e-value*) quando analisados no BLAST frente a todas as sequências do SBV depositadas no GenBank, até o momento da análise. Com outras sequências alheias, incluindo outros bunyavírus como o vírus Shamonda, o qual possui alto grau de identidade com o segmento S do SBV (alvo dos *primers* e sonda), esses parâmetros não foram adequados, principalmente baixos valores de *scores*, evidenciando assim a confiança no uso desses *primers* e sonda de hidrólise e a não necessidade de desenho de novas sequências.

Para a padronização da RT-qPCR, foram realizados diversos ajustes, tanto na concentração dos reagentes como nas condições de reação. Posteriormente, foi avaliada a sensibilidade analítica da reação, a qual foi de 1 cópia de RNA por microlitro num Cq de aproximadamente 36 e este foi determinado como o limiar de detecção da prova, que foi considerada uma reação altamente sensível.

Também foi construída uma curva padrão para a quantificação do SBV, que foi gerada através do ponto de corte dos valores de Cq em fase linear logarítmica de amplificação frente diluições do vírus, para calcular o coeficiente angular da reta (*slope*) e para calcular a eficiência da amplificação (*E*).

Neste estudo foi construída uma curva padrão típica, que é configurada por pelo menos cinco pontos com amostras de concentração sabidas e que se situam entre a faixa de concentração esperada do alvo (10^6 a 10^0 cópias de RNA/ μ L). A eficiência da curva padrão construída neste estudo foi de 1,98 e o *slope* -3,365 e erro 0,01.

A inclinação (*slope*) da curva padrão descreve a cinética da amplificação por PCR, o que indica a rapidez com que a quantidade de ácido nucleico alvo pode aumentar com os ciclos de amplificação.

Uma reação de amplificação perfeita produziria uma curva padrão com uma eficiência de 2, porque a quantidade de ácido nucleico alvo dobraria a cada ciclo de amplificação sendo que um *slope* de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 2.

O valor do erro (erro quadrático médio dos pontos de dados únicos ajustado à linha de regressão) é uma medida de precisão da quantificação baseado na curva padrão, sendo que um valor aceitável deve ser $< 0,2$, ou seja, quando determinar onde o ponto de cruzamento de uma amostra desconhecida cai na curva padrão, determina-se a concentração inicial do DNA alvo na amostra, sendo que o erro é uma medida da precisão da quantificação resultado baseado na curva padrão.

Assim, os valores obtidos neste estudo ficaram dentro do padrão esperado (*slope* de aproximadamente -3,3, eficiência de aproximadamente 2,0 e erro > 0,02), o que indica a otimização e padronização da técnica e construção de uma curva padrão confiável e robusta.

Também, os valores de *Threshold* (Noiseband) foram baixos e variaram de forma aceitável entre as reações. A posição de *Noiseband* ideal é tão baixa quanto possível, sem incluir qualquer ruído de fundo, e tão alto quanto necessário, onde claramente cruza todas as curvas de amostra na parte inferior da curva de amplificação.

Para a precisão inter-ensaio e intra-ensaio, foi avaliado o coeficiente de variação do Cq obtidos para cada diluição padrão, testado em três reações independentes e em triplicata. Como não houve variação significativa dos Cq, conclui-se que se tratam de reações precisas, como também as reações apresentaram repetibilidade e reprodutibilidade, pois não houve variação da curva padrão nas três corridas independentes, em triplicada.

Não houve diferença significativa de sensibilidade das diluições realizadas em água *nuclease-free*, extraídos de sangue total e pool de órgão de fetos abortados e natimortos sabidamente negativos para SBV, como também todas as amostras foram positivas para o gene da β - actina e as contaminadas manualmente com o controle padrão 10^3 cópias de RNA/ μ L foram positivas para SBV e sem variação significativa de Cq, indicando que não há inibidores de PCR, como também a qualidade da extração das amostras e integridade do RNA, o que garantiu que se uma amostra fosse positiva, certamente ela seria detectada, mesmo com baixos títulos virais, uma vez que a reação de RT-qPCR padronizada possui alta sensibilidade (1 cópia de RNA/ μ L).

Foi verificada a possibilidade da utilização de uma RT-qPCR em multiplex, para amplificação tanto do SBV como do gene endógeno em uma mesma reação e ao mesmo tempo e constatou-se que a sensibilidade analítica da RT-qPCR em multiplex em comparação as reações realizadas separadamente pela curva padrão testada em três reações realizadas em dias diferentes e em triplicata não diferiram, demonstrando a possibilidade do uso da multiplex, proporcionando mais rapidez e economia no diagnóstico do SBV.

Até 2011, membros do sorogrupo Simbu estavam distribuídos na Ásia, África, Oriente Médio e Austrália, mas não haviam sido reportados na Europa. Após o surgimento do SBV em 2011, o qual pertence ao sorogrupo Simbu, casos já foram relatados em diversos países europeus, incluindo mas não limitados Alemanha, Holanda, França, Bélgica, Suécia, Rússia, Irlanda, entre outros (USDA, 2014)

O vírus Schmallenberg ainda está se difundindo e tende a ultrapassar as fronteiras europeias. Enquanto houverem vetores e populações hospedeiras suscetíveis disponíveis, ele

continuará se espalhando e/ou se tornará endêmico. A taxa de espalhamento do SBV foi estimada em 0.9 a 1.5 km/dia (ENDALEW et al., 2019).

Na Holanda, um dos primeiros países afetados pelo SBV, sua introdução ocorreu na primavera/verão de 2011 (março/ agosto) e levou a altas taxas de soroprevalência em ruminantes, principalmente em bovinos não leiteiros, apesar da porcentagem de bezerros suspeitos PCR positivos para SBV ter sido baixa em relação a taxa de soropositividade, provavelmente porque as mães foram infectadas fora do período crítico da gravidez, o que indica uma considerável subestimação da taxa real de infecção da população na época, se considerar apenas casos suspeitos baseados em malformações congênitas e natimortos. Dentro do rebanho, após essa temporada de surto, quase 100% dos animais foram infectados e desenvolveram anticorpos contra o SBV (ELBERS et al., 2012a).

No final do verão início do outono de 2011 (agosto/setembro) houve a primeira extensa circulação do SBV na Bélgica, com o pico de abortos e fetos mal formados em dezembro de 2011 a janeiro de 2012 em ovinos e março a maio de 2012 para bovinos (POSKIN et al., 2016).

A soroprevalência em ovinos belgas foi extremamente alta no inverno de 2011 a 2012, sendo que a soroprevalência entre os rebanhos foi de quase 100% e a soroprevalência dentro da maioria dos rebanhos positivos (70%) foi acima de 80%, ou seja, até então quase todo o rebanho ovino belga tinha entrado em contato com o SBV. Em caprinos o nível de infecção foi menor do que ovinos e bovinos, ou seja, uma população considerável de caprinos permaneceu suscetível e poderia manter a infecção na Bélgica durante a estação de transmissão seguinte (MÉROC et al., 2014).

No mesmo período na Bélgica, a soroprevalência entre os rebanhos bovinos foi de 99,76% e a soroprevalência dentro do rebanho foi de 86,3%, porcentagens essas semelhantes a outros países da Europa. Ainda, constatou-se que a distribuição geográfica da soroprevalência dentro do rebanho foi homogeneamente muito alta e que após o primeiro episódio de SBV na Bélgica, quase todos os bovinos com mais de 6 meses já haviam sido infectados pelo vírus e que o mesmo foi difundido na Bélgica durante o inverno de 2011 (POSKIN et al., 2013).

Na França o SBV surgiu no inverno de 2011 a 2012 e se espalhou rapidamente pelo noroeste durante a primeira onda de infecção (janeiro a agosto de 2012), em um nível de morbidade moderada, sendo que os primeiros casos congênitos em pequenos ruminantes ocorreram em janeiro de 2012 e devem ser resultados de infecções ocorridas em setembro e outubro de 2011. Estudos sorológicos mostraram que o SBV estava circulando na França nesse período e que iniciou-se o mais tardar em outubro de 2011 (DOMINGUEZ et al., 2014; GACHE et al., 2018).

O SBV continuou a sua expansão e 1 ano após sua emergência na Europa, 75% dos bovinos efetivos a norte da Suécia, alcançando a latitude 65°N (apenas 320 km de polo Norte), foram expostos ao vírus, chegando ao sul em menos de 4 meses (em comparação ao BTV que chegou ao sul da Suécia apenas 2 anos depois da sua aparição no noroeste da Europa), demonstrando a capacidade e rapidez de espalhamento e por longas distâncias do SBV, uma vez introduzido (CHENAIS et al., 2015).

Após os primeiros relatos do SBV em rebanhos europeus em 2011 e 2012 (exemplificados acima), observou-se um período de ausência de doença clínica e declínio da soropositividade da população de ruminantes residentes nos países afetados em 2011 e 2012 (STAVROU et al., 2017).

Na Bélgica, por exemplo, no inverno de 2012 a 2013 todos os rebanhos amostrados em um estudo transversal foram reagentes para SBV com soroprevalência dentro do rebanho de 65,66% , portanto uma redução estatisticamente significativa entre início e fim de 2012, o que indica que o processo da epidemia diminuiu após o período de transmissão de 2011, com ocorrência de poucos casos durante o período de transmissão em 2012. Porém, o nível de imunidade contra o SBV dos animais infectados permaneceu alto após 1 ano e os animais nascidos permaneceram suscetível (grupos etários de animais desprotegidos) ou seja, o SBV estava circulando em algumas partes do país, mas a disseminação do vírus diminuiu consideravelmente (MÉROC et al., 2015).

Também na França, os surtos de SBV congênito foram relatados esporadicamente na segunda temporada de vetores (agosto a setembro de 2013), devido a imunidade do rebanho (DOMINGUEZ et al., 2014; GACHE et al., 2018).

Na Irlanda no final de 2012 e em 2013, a parte do sul e sudeste do país já havia sido exposta ao SBV, enquanto o norte e noroeste permaneciam predominantemente não infectados, sendo que em 2013 (segunda temporada de vetores) houve indícios de pouca expansão da área exposta anteriormente ao SBV (COLLINS et al., 2016).

Mas, apesar de circular em um nível baixo e com pouca ocorrência na Europa em 2013, o SBV continuou sua expansão para outros países como na Rússia, onde só apareceu apenas na segunda temporada, mas os casos corresponderam a 36,78% do total de casos do mundo, sendo que a maioria dos bovinos infectados foram importados de países que já tinham relatado a ocorrência do SBV (BOUCHEMLA et al., 2018).

Desde o surto inicial em 2011, conforme houve a reposição do rebanho (com nascimento de novos animais, por exemplo), houve a diminuição da imunidade do rebanho promovendo redução soroprevalência (MÉROC et al., 2015), sendo que nenhuma soroconversão foi

detectada em 2014 e 2015 na Irlanda e Reino Unido, indicando uma presumida ausência de infecção nesses anos (COLLINS et al., 2017b).

Na Irlanda em 2014, a soroprevalência foi alta (cerca de 60% em nível de animal) e prevalência de infecção foi baixa em animais ingênuos após a temporada de vetores, o que sugere que o SBV circulou em um nível muito baixo nesse período (COLLINS et al., 2016).

Na França, devido a imunidade do rebanho na terceira temporada (agosto 2014), numerosos casos foram relatados ao sul e oeste e surtos esporádicos em todo o país (DOMINGUEZ et al., 2014; GACHE et al., 2018).

Na Irlanda em 2015 não houve evidências de circulação do SBV e uma grande população de animais soronegativos foram identificados, o que proporcionou uma recirculação do SBV no território em 2016 (COLLINS et al., 2016).

Assim, o SBV continuou a circular em um nível baixo na Europa continental em 2014 e foi detectado na Alemanha em 2015 (WERNIKE et al., 2015b) e na Bélgica em 2016 (DELOOZ et al., 2017). Houve evidências de aumento da circulação no Reino Unido em 2016 com surtos de diarreia em bovinos vinculadas ao SBV com vários relatos de casos clínicos e soroconversão (STAVROU et al., 2017).

Na Bélgica, o relacionamento íntimo entre imunidade de rebanho e focos de malformações congênicas resulta no declínio da imunidade de rebanho no verão de 2016 seguido por um aumento repentino na soroprevalência contra SBV e surto de malformações congênicas no inverno de 2017, porém com extensão menor do que o surto inicial (em 2011), provavelmente porque os animais soropositivos para SBV impediram que o SBV se disseminasse de forma exponencial. Também houve relatos de aumento de circulação do SBV em 2015 e 2016 na Holanda (DE REGGE, 2017).

Na França, de setembro 2016 a agosto de 2017, houveram três vezes mais casos de SBV do que em 2015 e 2016, o que indica que o SBV circulou no território em níveis baixos durante 2013 a 2016 e a substituição natural do rebanho resultou em baixos níveis de imunidade de rebanho no início da temporada de vetores de 2016 (DOMINGUEZ et al., 2014; GACHE et al., 2018).

Na Hungria, um estudo retrospectivo analisou 537 casos naturais de aborto em ruminantes domésticos que ocorreram entre 2011 e 2017. A infecção por SBV foi encontrada em 0,8% dos casos, indicando assim a baixa incidência de infecção pelo SBV na Hungria nesse período (SZEREDI et al., 2020).

Em 2017 e 2018 na Alemanha, o nível da circulação do SBV permaneceu baixo, mas em 2019 novamente foram relatados os casos em maior medida, indicando que o SBV circulou

novamente em território alemão, geneticamente estável ao longo dos 9 anos (WERNIKE; BEER, 2020).

Essa alternância entre circulação em um nível baixo e ressurgimento em maior extensão do SBV em regiões endêmicas ocorre de tempos em tempos devido a uma combinação de número de animais suscetíveis atingirem um nível crítico juntamente com condições favoráveis para os vetores, presença de hospedeiro reservatório selvagem e/ou doméstico, sendo que a cada nova geração há o nascimento de animais suscetíveis, ou seja, a taxa de reposição do rebanho (em média de 20 a 25% anualmente em empresas agrícolas) influencia fortemente no número de animais suscetíveis. Portanto deve-se prever que o SBV tenha estabelecido um status enzoótico na Europa e reaparecerá em maior escala e em intervalos regulares no futuro com emergências e re-emergências (a cada 3 a 5 anos em países europeus) (STAVROU et al., 2017; WERNIKE; BEER, 2019).

Um estudo retrospectivo sorológico realizado na França demonstrou que o SBV está onipresente em animais selvagens, nos quais foram detectados títulos de Ac contra o SBV, que variaram de acordo com o período e localização, indicando alto grau de espalhamento do vírus em quase todos os tipos de habitat e níveis de elevação e amplo painel de espécies. Assim, em comparação com o BTV, o SBV infectou mais espécies de animais silvestres que estavam presentes, em maior nível de prevalência e em áreas maiores, principalmente em regiões montanhosas, espalhou-se de forma indistinta entre machos e fêmeas e com uma transmissão independente da epidemia em rebanhos domésticos, embora em 2013 e 2014 observou-se uma diminuição, semelhante ao que ocorreu em rebanhos domésticos (ROSSI et al., 2017).

Na América Central e do Sul, ainda não há estudos e/ou relatos sobre a ocorrência do SBV até o momento. Nos Estados Unidos em 2012, nem as espécies de *Culicoides* relacionadas com a transmissão do SBV na Europa e nem a doença clínica pareceu estar presente, embora haja mais de 110 espécies de *Culicoides* potencialmente competentes no território. No entanto, a probabilidade do SBV ser importado para os Estados Unidos por todas as vias (animais vivos, produtos de origem animal, comércio ou tráfego de passageiros) é considerada baixa, pelas regulamentações de importações existentes e vias de controle que minimizam a probabilidade de sua introdução no rebanho norte-americano (USDA, 2012;UDSA, 2014).

Até o momento, não há estudos da ocorrência do SBV no Brasil assim como não há diagnóstico laboratorial estabelecido. Assim, não é realizado diagnóstico, pesquisa ou vigilância em animais brasileiros, sendo este estudo portanto, pioneiro nessa área.

Se o SBV fosse introduzido no Brasil, assumindo que os animais brasileiros sejam imunologicamente ingênuos e que várias espécies de *Culicoides* como vetores potenciais estão

presentes, ele se espalharia rapidamente e seria difícil seu controle devido à falta de resistência imunológica em animais e a abundância de vetores potencialmente competentes.

As possíveis rotas de introdução do SBV no Brasil poderiam ser pela importação de sêmen de touros e animais de países infectados, assim como transmissão vetorial com o trânsito de pessoas e mercadorias nas quais larvas e *Culicoides* portadores do SBV poderiam ser transportados por aeronaves e navios. Alguns produtos biológicos (como vacinas e soros comerciais) contaminados por SBV poderiam também resultar em soroconversão ou surtos da doença (VELDHUIS et al., 2019).

O aumento de viagens e do comércio tanto legal quanto ilegal de animais e produtos animais contribuem para a introdução e estabelecimento de doenças transmitidas por vetores em novas áreas geográfica, além da mudança climática que facilita que as doenças transmitidas por vetores se movam para fora dos trópicos, para latitudes temperadas. A disseminação do SBV não é limitada por fronteiras territoriais e sua incursão em áreas anteriormente livres é difícil de ser evitada (VELDHUIS et al., 2019)

O comércio de animais vivos é considerado um dos principais modos de introdução de vírus em áreas livres de doenças. Devido a mudanças sociais e comportamentais, algumas espécies de animais silvestres podem, hoje em dia, ser consideradas como espécies de estimação como também a diversidade de espécies de animais envolvidos no comércio internacional está aumentado, o que poderia beneficiar agentes patogênicos que possuem uma ampla diversidade de hospedeiros, como é o caso do SBV (DURAND et al., 2013).

Além disso, espera-se que doenças transmitidas por vetores, fatores como condições climáticas, densidade vetorial e infecciosidade vetorial sejam mais importantes do que a densidade animal (DURAND et al., 2013).

Assim, uma vez introduzido, provavelmente a dinâmica do SBV em território brasileiro ocorresse de forma similar a dos países em que já foi relatada sua ocorrência: com flutuação ao longo do tempo na ocorrência de casos de abortos e natimortos e outras manifestações clínicas, dependente da imunidade de rebanho, assim como nas taxas de soroprevalência (geralmente altas).

Como o Brasil é destaque no comércio internacional do agronegócio (inclusive com diversos países da Europa) e levando-se em consideração o risco da introdução do SBV em qualquer período (pela dinâmica da sua ocorrência em países já afetados, discutido acima), este estudo foi realizado para obter evidência da presença do SBV em amostras de pool de órgãos de fetos abortados e natimortos, pertencentes a um banco de conveniência e coletados entre janeiro de 2011 a dezembro de 2018 (garantindo a abrangência temporal na pesquisa do agente),

como também foram analisadas amostras de sangue total e de soro para avaliar circulação do SBV no Brasil.

Supondo que o SBV já tivesse sido introduzido no Brasil e que sua prevalência seja de pelo menos 20% (prevalência projetada inferior aos casos europeus sendo que a prevalência mínima encontrada nos dados da literatura foi 30% em épocas de baixa temporada), foi calculado o tamanho aproximado de amostra (246 animais) necessário para estimar a prevalência do SBV em uma população de estudo considerada infinita (animais brasileiros), com uma precisão absoluta de 5% e com intervalo de confiança de 95%. Assim, se o SBV ocorresse no Brasil a uma prevalência de 20%, com os tamanhos das amostras analisadas neste estudo (sangue total, feto abortado e soro), possivelmente 1 animal positivo seria detectado. Nesse estudo, analisou-se ainda mais amostras que o estimado, chegando até a uma prevalência esperada de 50% (tamanho máximo de amostra). Dada a natureza do SBV, assumiu-se que o desenho amostral do presente estudo foi apropriado para verificar a sua ocorrência no Brasil.

Apesar de distintos, o vírus da Língua Azul (BTV) e o SBV apresentam certas características epidemiológicas e manifestações clínicas em comum. Ambos são arboviroses transmitidos por mosquitos *Culicoides* sp e causam malformações congênitas, abortos e natimortos. Após o surgimento inesperado do sorotipo 8 do vírus da Língua Azul (BTV-8) no norte da Europa em 2006 e depois BTV-6 e 11, o SBV surgiu na mesma região em 2011 causando uma nova doença economicamente importante em ruminantes, levantando a hipótese de que ambos seguiram a mesma rota de introdução, ou seja, o SBV pode ter estado presente antes em uma região do mundo onde nenhuma manifestação clínica foi observada ou relatada e, considerando o comércio internacional de animais e produtos de origem animal dentre formas de disseminação, houve a sua expansão para outras regiões suscetíveis (DOCEUL et al., 2013).

Assim, da mesma forma que ocorreu na Europa, poderia ter ocorrido no Brasil. As amostras de sangue analisadas neste estudo foram encaminhadas ao Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico para certificação de rebanho livre de BTV e foram diagnosticadas algumas amostras RT-qPCR positivas para BTV (cerca de 2%). Devido à semelhança epidemiológica entre BTV e SBV na Europa, pesquisou-se a presença do SBV em tais amostras, porque a positividade para BTV indica a circulação e atividade do mosquito vetor na região, além do que, as diversas épocas de colheita e em diversas regiões de onde as amostras provêm (municípios de Abaetuba/PA e Barretos/SP) são propensos a ocorrência do SBV (clima favorável, presença do mosquito vetor e grande concentração de animais por área). Além disso, os animais tinham idade de 0 a 12 meses, com grande possibilidade de ainda não terem soroconvertido e, portanto, imunologicamente incapazes de resolver a infecção, aumentando as

chances de o animal estar em viremia. Apesar disso, não houveram amostras de sangue positivas para o SBV (0/1665).

Como as amostras de pool de órgão de fetos abortados e natimortos pertenciam ao banco de conveniência do Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico localizado em São Paulo, a maioria dos fetos analisados foram provenientes da região sudeste do Brasil (estados de São Paulo e Minas Gerais). Isso ocorreu por uma questão logística e não epidemiológica, o que não descarta a importância e a confiabilidade da pesquisa da ocorrência do SBV nas amostras de tal banco, pois também foram analisadas amostras provenientes de todas regiões brasileiras (figura 16).

Como o SBV afeta principalmente rebanhos ovinos, bovinos e caprinos, foram analisadas amostras de fetos abortados tanto de bovinos (283/313) como de caprinos (5/313), ovinos (23/313) e bubalinos (2/313), sendo este último também um hospedeiro confirmado para SBV, mas nenhuma dessas amostras foram RT-qPCR positivas para SBV. Na Alemanha em 2012 obteve-se uma soroprevalência em rebanhos caprinos de 36,7% (sendo que a prevalência intra-rebanho variou entre 3,3 e 93,3%), soroprevalência muito menor do que a obtida em rebanhos bovinos (cerca de 80% em rebanhos alemães e 72,5% em holandeses) e rebanhos ovinos (60% em rebanhos alemães), sendo que a prevalência intra-rebanho difere de um país para outro, corroborando a importância dessas espécies na epidemiologia do SBV (WERNIKE et al., 2014).

As amostras de fetos analisadas estavam em diversos estágios gestacionais como também natimortos ou óbitos um dia após o nascimento, porém a grande maioria estava no terço final da gestação (37%- 115/313). A idade das mães variou de menores de 36 meses a 9 anos. Em estudos anteriores, não foi observada correlação entre a idade materna e a ocorrência de aborto por SBV, assim como o período gestacional em que o feto se encontrava. No entanto, nota-se que defeitos teratogênicos e sua gravidade estão associados ao estágio gestacional ao qual houve a infecção, sendo que se ocorrer antes do desenvolvimento do sistema imunológico e vulnerabilidade do SNC fetal (por volta de 40 e 180 dias em bovinos) lesões severas são observadas, assim como a severidade depende também de interações complexas entre neurogenese fetal, imunocompetência, virulência da cepa viral e tempo de infecção. Infecções ocorridas nos primeiros meses de gestação provavelmente causa morte embrionária com reabsorção fetal ou aborto e repetição de cio. Se ocorrer do meio para o final da gestação observa-se malformação fetal, abortos e natimortos (MARTINELLE et al., 2015; ESTEVES et al., 2016a).

A mortalidade fetal causa importantes perdas reprodutivas em animais domésticos e tem impacto significativo na rentabilidade nos sistemas de produção animal. No entanto, o diagnóstico diferencial de aborto é sempre um desafio, pelas dificuldades de abranger todos os agentes causadores e assim oferecer resultados conclusivos. Sendo assim, é necessário iniciar pelos mais prováveis agentes causadores, como *Neospora caninum*, Diarreia Viral Bovina (BVD), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BoHV-1), Vírus da Língua Azul (BTV), assim como agentes bacterianos, e em casos negativos, avançar na investigação incluindo outros agentes, como o SBV, e assim diminuir a lacuna diagnóstica de aborto sem resposta sobre a verdadeira causa.

Segundo Antoniasse e colaboradores (2013) somente 30% dos fetos bovinos abortados analisados obtêm-se diagnóstico etiológico definitivo, em virtude das múltiplas causas envolvidas, já que muitos agentes, infecciosos ou não, podem estar envolvidos, o que corrobora com os achados do presente estudo, onde foi realizado diagnóstico das principais causas virais de aborto assim como *Neospora caninum* e, em algumas amostras, exame bacteriológico incluindo *Leptospira* sp e, para a grande maioria das amostras, não obteve-se diagnóstico conclusivo.

O principal agente infeccioso associado ao aborto foi *Neospora caninum* (11%- 27/256) evidenciando a importância dessa causa de aborto nos rebanhos bovinos brasileiros, seguido de BVDV (2%- 6/290) corroborando achados de Flores e colaboradores (2005). Não foram encontrados fetos positivos, tanto para BoHV-1 (0/286) como para BTV (0/309). Ressalta-se que os resultados aqui apresentados foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico.

Diversas espécies de bactérias oportunistas podem causar septicemia e aborto em bovinos. Geralmente causam aborto esporádico dentro de uma propriedade, sendo a via hematogênica a principal rota de infecção (ANTONIASSE, 2013). Nas amostras analisadas que foi realizado exame bacteriológico pelo Laboratório Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo, foram encontradas algumas bactérias oportunistas como: *Acinetobacter* spp, *Actinobacillus* spp, *Alcaligenes faecalis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Campylobacter fetus* sub sp *venerealis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. (beta hemolítico), *Trueperella pyogenes*, mas na grande maioria não foi encontrado agente bacteriano envolvido. Nenhuma das amostras que foram testadas para *Leptospira* sp foram positivas (0/146).

A maioria das propriedades das quais as amostras pertenciam possuíam uma taxa de aborto >3% (52%- 76/147), como também relatos do aumento do número de abortos nos

últimos 3 meses. A incidência de aborto é variável de propriedade para propriedade, sendo que os índices de 1% a 2% no rebanho são considerados normais. No entanto, ao atingir 3%, determina-se a necessidade de cautela e medidas frente ao rebanho. Acima de 3% é considerado um problema infeccioso ou ambiental que acomete os bovinos (RIET-CORREA et al, 2001).

O tipo de criação predominante dos rebanhos de onde as amostras de fetos foi proveniente foi de leite (62%- 137/222) seguido de corte (27%- 61/222) com tipo de exploração semi-intensivo (54%- 112/210) seguido de intensivo (29%- 62/210).

De um modo geral, o risco de infecção pelo SBV não é significativamente influenciado pela idade, raça do gado, tipo de exploração e criação ou tamanho do rebanho, o que implica que a diversidade de práticas de criação animal não é atrelado ao risco de infecção por SBV, que depende significativamente da densidade do gado local e presença do mosquito vetor, embora em rebanhos leiteiros e reprodutivos o impacto é maior devido à queda na produção de leite e taxa reprodutiva como, por exemplo, aumento do número de abortos (STEINRIGL et al., 2014).

A grande maioria dos rebanhos eram vacinados para Brucelose, Raiva, Leptospirose, Febre Aftosa, Carbúnculo, BVD, Botulismo, Clostridioses e IBR. Assim, provavelmente os rebanhos estavam protegidos contra a infecção desses agentes, descartando a possibilidade da ocorrência destes no rebanho.

Tipicamente, os casos de SBV são identificados apenas quando ou se os animais apresentam malformações congênitas e aborto. Esta falta de apresentação clínica evidente é a razão principal da existência de uma subestimação da ocorrência do SBV.

Testes de laboratório confiáveis para a detecção do SBV são imprescindíveis tanto na pesquisa da ocorrência como também no monitoramento, pois muitos países europeus são obrigados a comunicar as autoridades competentes casos suspeitos de SBV assim como países onde nunca foi relatada a sua ocorrência. A detecção do RNA viral por RT-qPCR é uma opção confiável na detecção da infecção aguda. Mas devido a possibilidade de degradação do RNA viral (devido ao tempo da amostragem e más condições de transporte e armazenamento), como também curto período de viremia e ausência de manifestações clínicas em macho e em algumas fêmeas, o número de casos clínicos pode ser subestimado. Neste cenário, estudos sorológicos são necessários para estimar a ocorrência e número real de animais infectados por SBV numa população (PEJAKOVIĆ et al., 2018).

Em um estudo realizado por Pejakovic e colaboradores em 2018 avaliou a especificidade, sensibilidade e desempenho diagnóstico de três ensaios sorológicos diferentes para detecção e monitoramento do SBV: teste de ELISA utilizando os kits IDEXX

Schmallenberg Ab Test (IDEXX), ID Screen[®] Schmallenberg virus Competition Multi-species (IDvet) e reação de Vírus Neutralização (VN). Concluiu que em infecções massivas e situações de alta prevalência, os três ensaios foram capazes de detectar a infecção por SBV. No entanto, em situações de baixa soroprevalência, o teste IDEXX não foi capaz de detectar o SBV em nível populacional (menor sensibilidade, mesmo sendo ambos os ELISAs baseados na capacidade de detectar Ac contra a proteína N do SBV), sendo que o ELISA da IDvet e VN foram capazes.

Entretanto, como a VN é um teste demorado na obtenção dos resultados (tempo de incubação para leitura de quatro dias ou mais), torna-se impraticável o seu uso em estudos de monitoramento e vigilância.

Anticorpos específicos para vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu podem reagir de forma cruzada com outros membros do grupo em testes de fixação de complemento ou ELISAs, pois ambos são baseados na detecção de anticorpos não neutralizantes específicos de nucleoproteínas, ao passo que a VN detecta anticorpos neutralizantes dirigidos as glicoproteínas codificadas pelo segmento M do genoma do SBV (WERNIKE; BEER; HOFFMANN, 2017).

Assim, de modo geral, anticorpos contra N-proteínas podem reagir de forma cruzada, enquanto anticorpos contra Gn e Gc são espécies específicos ou até mesmo cepas específicas, lembrando que anti-Gn geralmente não tem atividade neutralizante e anti-Gc possui essa atividade (HEIJDEN et al., 2013)

Essa reatividade cruzada já foi relatada nos testes de ELISA ID Screen[®] Schmallenberg virus Competition Multi-species (IDvet) e IDEXX Schmallenberg Ab Test (IDEXX), mas não no kit ID Screen[®] Schmallenberg virus Indirect Multi-species, (IDvet). Como nos resultados de Pejakovic e colaboradores (2018) houve concordância quase que perfeita entre a VN e o ELISA da IDvet e não houve relatos de reatividade cruzada no ELISA indireto da IDvet, indicando uma excelente sensibilidade diagnóstica e especificidade, foi utilizado neste estudo o kit ELISA indireto da IDvet (WERNIKE; BEER; HOFFMANN, 2017).

Em rebanhos infectados confirmados por RT-qPCR, mais de 94% de ovelhas e 99% das vacas são soropositivas para SBV. Em rebanhos suspeitos, ou seja, o SBV não foi confirmado por RT-qPCR, a soroprevalência é um pouco menor do que em rebanhos infectados, mas ainda alta, o que demonstra a importância dos testes sorológicos na detecção do SBV. Elevadas soroprevalências, tanto a nível regional como também dentro de rebanhos, com e sem manifestações clínicas óbvias é comum para vírus relacionados a SBV. Na Austrália, os estudos de soroprevalência do vírus Akabane (AKAV) revelaram soroprevalências dentro do rebanho de 77% em 1964 até 89% em 1971 e 99% em 1988 na área de New South Wales. Além disso,

no Japão, 74% dos bovinos aparentemente saudáveis que coabitavam com vacas que apresentavam manifestações clínicas de uma infecção por AKAV também eram soropositivos. Na Holanda, também é relatada uma alta soroprevalência do SBV (LOEFFEN et al., 2012).

Uma pesquisa nacional realizada na Suíça de amostras de leite de tanque detectou que a soroprevalência do rebanho aumentou de 19,7% em julho de 2012 para 99,5% em dezembro de 2012, resultados semelhantes aos encontrados na Bélgica e na Holanda onde a soroprevalência do rebanho foi de 95 e 100% em bovinos após uma temporada de vetores (LECHNER et al., 2017).

Assim, se o SBV é introduzido em uma região, quase a totalidade dos animais soroconvertem e anticorpos anti-SBV persistem na maioria dos bovinos infectados por pelo menos 6 anos ou até mesmo pelo resto da vida. A soroprevalência intra e entre rebanhos varia conforme há reposição de animais ingênuos e emergência e re-emergências do SBV de tempos em tempos (já discutido anteriormente) mas sempre com animais soropositivos (WERNIKE et al., 2018).

A região Norte do Brasil apresenta o segundo maior rebanho do país, sendo que a maior população bovina do Amazonas se concentra na região Sul, pelo baixo preço das terras, disponibilidade hídrica, clima favorável e pela tradição pecuária da região. O rebanho do Amazonas apresenta um pequeno crescimento da população bovina desde 2016 (IBGE, 2017).

O município de Humaitá situa-se a margem do Rio Madeira (sul do estado do Amazonas) e faz divisa com o estado de Rondônia. Segundo a ADAF (2018) possui um rebanho de 22.824 bovinos em 216 propriedades ativas, sendo que o rebanho desta região vem crescendo desde 2013. Vale ressaltar que na região é comum o sistema comercial de criação sem controle zootécnico e animais arrendados são descarregados e alocados juntos aos outros bovinos já existentes nas propriedades. As amostras analisadas neste estudo corresponderam a 20% do rebanho bovino cadastrado na ADAF de Humaitá em 2017, a partir da notificação da vacinação contra a febre aftosa. Foram analisadas 596 amostras de fêmeas bovinas, sendo 143 com idade entre 13 a 24 meses, 115 com idade entre 25 a 36 meses e 338 com idade acima de 36 meses, portanto, nenhum animal analisado tem possibilidade de ser reagente por anticorpos de origem colostrar.

Uma amostra de cada propriedade foi selecionada aleatoriamente para detecção de anticorpos anti-BTV e todas foram reagentes e com títulos altos de anticorpos (26/26), indicando a circulação do mosquito vetor na região, o que é relevante uma vez que BTV e SBV são transmitidos pelo mesmo vetor e possuem características epidemiológicas semelhantes na Europa.

Como já dito anteriormente, se o SBV fosse introduzido no Brasil, ele se espalharia rapidamente e altos índices de soroprevalência seriam encontrados, desde animais que entraram em contato em temporadas vetoriais em anos anteriores até as mais recentes.

As amostras de soro deste estudo foram selecionadas a partir de rebanhos com características que propiciam a ocorrência do SBV e animais de faixas etárias que abrangiam tanto os que possivelmente soroconverteram recentemente, com base no período de temporada vetorial no Brasil (apesar do clima da região ser favorável o ano inteiro) e ondas de infecção na Europa, quanto animais que possivelmente entraram em contato com o SBV em temporadas vetorial e ondas de infecção anteriores. Apesar disso, nenhum animal analisado apresentou anticorpos anti-SBV (0/596).

Regulamentos quanto a importação de animais vivos e germoplasmas tanto da União Europeia como de países que notificaram ou notificarão a doença foram adotados no início de 2012 (capítulo 3.13 Legislação Brasileira) para mitigar a introdução do SBV no Brasil. De acordo com os resultados encontrados nesse estudo, essas medidas foram eficientes, pois não foram encontrados indícios tanto moleculares como sorológicos da presença do SBV nas amostras analisadas.

Diferentes abordagens de vigilância, incluindo vigilância sindrômica, vigilância de aborto, vigilância sentinela e vigilância de *Culicoides*, bem como estudos epidemiológicos transversais, provaram sua utilidade e complementaridade para entender a epidemia do SBV. Quando um país está livre de um patógeno, mas com risco de sua introdução, a vigilância destina-se a detectar precocemente os surtos a partir de indicadores de saúde e doenças em populações definidas, para aumentar a probabilidade de detecção oportuna de ameaças indefinidas (novas) ou inesperadas (exóticas ou reemergentes) A escolha e/ou combinação de diferentes componentes de vigilância é influenciada principalmente pela situação epidemiológica e/ou pelo objetivo da estratégia de vigilância, para detectar o mais rápido possível a doença ou agente, a fim de evitar uma grande epidemia (reduzir a transmissão), fornecer estratégias de intervenção adequadas se necessário (vacinação) e/ou reduzir, tanto quanto possível, o impacto econômico e as consequências. Isso ajudou cientistas, autoridades veterinárias e tomadores de decisão a aumentar o conhecimento sobre o SBV e deve ser considerado para continuar no futuro tanto nos países já implementados como em novos territórios, como é o caso do Brasil (VELDHUIS et al., 2019).

7 CONCLUSÃO

1. Construiu-se um controle positivo padrão sintético, inócuo e seguro para diagnóstico molecular do SBV no Brasil;
2. Foi padronizada e validada a RT-qPCR para detecção do RNA do SBV, sensibilidade analítica de 10^1 cópia de RNA/ μ L e com controles rigorosos. Assim estabeleceu e disponibilizou esse método para diagnóstico complementar e vigilância do SBV no Brasil;
3. Não foi detectado o RNA do SBV nas amostras analisadas de sangue total, fetos abortados e natimortos de animais brasileiros, portanto não foi evidenciado viremia e transmissão transplacentária do SBV nas amostras analisadas, dados importantes para a vigilância do SBV no Brasil;
4. Não foi detectado anticorpos anti-SBV nas amostras de soro bovinos analisadas portanto, não foi evidenciada infecção por SBV e posterior soroconversão dos animais analisados.
5. Embora as amostras pertencessem a um banco de conveniência, os dados obtidos sugerem que o SBV não circulou na população bovina estudada em território brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ABI-RIZK, A.; KANAAN, T.; HAGE, J. El. Seroprevalence of Schmallenberg virus and other Simbu group viruses among the Lebanese sheep. **Open Veterinary Journal**, v. 7, n. 3, p. 290–293, 2017.
- ADAF. Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas. Relatório de Estabelecimentos com Serviço de Inspeção Estadual – SIE. Gerência de Inspeção de Produtos de Origem Animal. 2018.
- ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Causas de aborto bovino diagnosticadas no setor de patologia veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 155–160, 2013.
- ASMARE, K.; SIBHAT, B.; AYELET, G.; GEBREMEDHIN, E. Z.; LIDETE, K. A.; SKJERVE, E. Serological evidence of Bovine herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea virus and Schmallenberg virus infections in relation to reproductive disorders in dairy cattle in Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 178, p. 236–241, 2018.
- AZKUR, A. K.; ALBAYRAK, H.; RISVANLI, A.; PESTIL, Z.; OZAN, E.; YILMAZ, O.; TONBAK, S.; CAVUNT, A.; KADI, H.; MACUN, H. C.; ACAR, D.; ÖZENÇ, E.; ALPARSLAN, S.; BULUT, H. Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 8, p. 1825–1828, 2013.
- BALMER, S.; GOBET, H.; NENNIGER, C.; HADORN, D.; SCHWERMER, H.; VÖGTLIN, A. Schmallenberg virus activity in cattle in Switzerland in 2013. **Veterinary Record**, v. 177, n. 289, p. 1–5, 2015.
- BARBER, J.; HARRUP, L. E.; SILK, R.; VERONESI, E.; GUBBINS, S.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; CARPENTER, S. Blood-feeding, susceptibility to infection with Schmallenberg virus and phylogenetics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 116, 2018.
- BESSELL, P. R.; AUTY, H. K.; SEARLE, K. R.; HANDEL, I. G.; PURSE, B. V.; DE C. BRONSVOORT, B. M. Impact of temperature, feeding preference and vaccination on Schmallenberg virus transmission in Scotland. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5746, p. 1–10, 2014.
- BILK, S.; SCHULZE, C.; FISCHER, M.; BEER, M.; HLINAK, A.; HOFFMANN, B. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1–2, p. 236–238, 2012.
- BLOMSTRÖM, A.-L.; STENBERG, H.; SCHARIN, I.; FIGUEIREDO, J.; NHAMBIRRE, O.; ABILIO, A. P.; FAFETINE, J.; BERG, M. Serological Screening Suggests Presence of Schmallenberg Virus in Cattle, Sheep and Goat in the Zambezia Province, Mozambique. **Transboundary and emerging diseases**, v. 61, n. 4, p. 289–292, 2014.
- BLOMSTRÖM, A.; GU, Q.; BARRY, G.; WILKIE, G.; SKELTON, J. K.; BAIRD, M.; MCFARLANE, M.; SCHNETTLER, E.; ELLIOTT, R. M.; PALMARINI, M.; KOHL, A.

Transcriptome analysis reveals the host response to Schmallenberg virus in bovine cells and antagonistic effects of the NSs protein. **BMC Genomics**, v. 16, n. 324, p. 1–8, 2015.

BOJKOVSKI, J.; VASIC, A.; BUGARSKI, D.; ZDRAVKOVIC, N.; VAKANJAC, S.; KABA, J.; CZOPOWICZ, M.; SILAGHI, C.; NIEDER, M.; SPINU, M.; PAVLOVIC, I. Schmallenberg virus antibodies detected in dairy cows in the Republic of Serbia. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 21, n. 4, p. 906–908, 2015.

BORKENT, A. R. T. World Species of Biting Midges (Diptera : Ceratopogonidae). p. 1–241, 2015.

BOSHRA, H. Y.; CHARRO, D.; LORENZO, G.; SÁNCHEZ, I.; LAZARO, B.; BRUN, A.; ABRESCIA, N. G. A. DNA vaccination regimes against Schmallenberg virus infection in IFNAR^{0/0} mice suggest two targets for immunization. **Antiviral Research**, v. 141, p. 107–115, 2017.

BOUCHEMLA, F.; AGOLTSOV, V. A.; LARIONOV, S. V.; POPOVA, O. M.; SHVENK, E. V. Epizootiological study on spatiotemporal clusters of Schmallenberg virus and Lumpy skin diseases : The case of Russia. **Veterinary World**, v. 11, n. 9, p. 1229–1236, 2018.

BOULOY, M.; PARDIGON, N.; VIALAT, P.; GERBAUD, S.; GIRARD, M. Characterization of the 5' and 3' ends of viral messenger RNAs isolated from BHK21 cells infected with germiston virus (bunyavirus). **Virology**, v. 175, n. 1, p. 50–58, 1990.

BRÜLISAUER, F.; SCHOLES, S.; CALDOW, G. L.; ROCCHI, M.; DAGLEISH, M. P.; CHIANINI, F. Role of Schmallenberg virus infection in congenital malformations in ruminants in Scotland in spring 2017. **Veterinary Record**, v. 181, n. 13, p. 341–343, 2017.

BURGIN, L. E.; GLOSTER, J.; SANDERS, C.; MELLOR, P. S.; GUBBINS, S.; CARPENTER, S. Investigating Incursions of Bluetongue Virus Using a Model of Long-Distance Culicoides Biting Midge Dispersal. **Transboundary and emerging diseases**, v. 60, n. 3, p. 263–272, 2013.

CHAIKOUTIS, S. C.; KIOSSIS, E.; GIADINIS, N. D.; BROZOS, C. N.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; BRÉARD, E.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; ZIENTARA, S.; DOVAS, O. P. C. I. Evidence of Schmallenberg virus circulation in ruminants in Greece. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 251–255, 2014.

CHENAIS, E.; STAHL, K.; FRÖSSLING, J.; BLOMQVIST, G.; K.NÄSLUND; SVENSSON, L.; RENSTRÖM, L.; MIEZIEWSKA, K.; ELVANDER, M.; VALARCHER, J. F. Schmallenberg Virus beyond Latitude 65 ° N. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 5, p. 11–18, 2015.

CLAINE, F.; COUPEAU, D.; WIGGERS, L.; MUYLKENS, B.; KIRSCHVINK, N. Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 154, p. 132–138, 2018.

COLLINS, Á. B.; BARRETT, D.; DOHERTY, M. L.; LARSKA, M.; MEE, J. F. Post-epidemic Schmallenberg virus circulation : parallel bovine serological and Culicoides virological surveillance studies in Ireland. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 234, p. 1–11, 2016.

- COLLINS, Á. B.; DOHERTY, M. L.; BARRETT, D. J.; MEE, J. F. Schmallenberg virus : a systematic international literature review (2011-2019) from an Irish perspective. **Irish Veterinary Journal**, v. 72, n. 9, p. 1–22, 2019.
- COLLINS, Á. B.; GRANT, J.; BARRETT, D.; DOHERTY, M. L.; HALLINAN, A.; MEE, J. F. Schmallenberg virus : Predicting within-herd seroprevalence using bulk-tank milk antibody titres and exploring individual animal antibody titres using empirical distribution functions (EDF). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 143, p. 68–78, 2017a.
- COLLINS, Á. B.; MEE, J. F.; KIRKLAND, P. D. Pathogenicity and teratogenicity of Schmallenberg virus and Akabane virus in experimentally infected chicken embryos. **Veterinary Microbiology**, v. 216, n. September 2017, p. 31–37, 2018.
- COLLINS, B.; BARRETT, D. J.; DOHERTY, M. L.; MCDONNELL, M.; MEE, J. F. Significant re-emergence and recirculation of Schmallenberg virus in previously exposed dairy herds in Ireland in 2016. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. 1359–1363, 2017b.
- COSTA, J. C.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. 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.
- COUPEAU, D.; CLAINE, F.; WIGGERS, L.; KIRSCHVINK, N.; MUYLKENS, B. S segment variability during the two first years of the spread of Schmallenberg virus. **Archives of Virology**, v. 161, n. 5, p. 1353–1358, 2016.
- CYBINSKI, D. H. Douglas and Tinaroo Viruses : Two Simbu Group Arboviruses Infecting Culicoides brevitarsis and Livestock in Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 34, p. 91–97, 1984.
- DALY, J. M.; KING, B.; TARLINTON, R. A.; GOUGH, K. C.; MADDISON, B. C.; BLOWEY, R. Comparison of Schmallenberg virus antibody levels detected in milk and serum from individual cows. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 56, p. 1–4, 2015.
- DANES, D.; BARAITAREANU, S.; GURAU, M. R.; DAN, M.; BARTOIU, A.; MOLDOVAN, H.; DANES, M. Preliminary Results of Schmallenberg virus Serosurveillance in Romania. **Advances in Environmental Technology and Biotechnology**, v. 26, p. 112–116, 2013.
- DE REGGE, N. Akabane, Aino and Schmallenberg virus — where do we stand and what do we know about the role of domestic ruminant hosts and Culicoides vectors in virus transmission and overwintering? **Current Opinion in Virology**, v. 27, p. 15–30, 2017.
- DELOOZ, L.; SAEGERMAN, C.; QUINET, C.; PETITJEAN, T.; DE REGGE, N.; CAY, B. Resurgence of Schmallenberg Virus in Belgium after 3 Years of Epidemiological Silence. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. 1641–1642, 2017.
- DOCEUL, V.; LARA, E.; SAILLEAU, C.; BELBIS, G.; RICHARDSON, J.; BRÉARD, E.; VIAROUGE, C.; DOMINGUEZ, M.; HENDRIKX, P.; CALAVAS, D.; DESPRAT, A.; LANGUILLE, J.; COMTET, L.; POURQUIER, P.; ELÉOUËT, J. F.; DELMAS, B.; MARIANNEAU, P.; VITOUR, D.; ZIENTARA, S. Epidemiology, molecular virology and

diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1–13, 2013.

DOMINGUEZ, M.; GACHE, K.; TOURATIER, A.; PERRIN, J. B.; FEDIAEVSKY, A.; COLLIN, E.; BRÉARD, E.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; ZANELLA, G.; ZIENTARA, S.; HENDRIKX, P.; CALAVAS, D. Spread and impact of the Schmallenberg virus epidemic in France in 2012-2013. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 248, p. 1–10, 2014.

DUCOMBLE, T.; WILKING, H.; STARK, K.; TAKLA, A.; ASKAR, M.; SCHAADE, L.; NITSCHKE, A.; KURTH, A. Lack of evidence for Schmallenberg virus infection in highly exposed persons, Germany, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 1333–1335, 2012.

DURAND, B.; LECOLLINET, S.; BECK, C.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, B.; BALENGHIEN, T.; CHEVALIER, V. Identification of Hotspots in the European Union for the Introduction of Four Zoonotic Arboviruses by Live Animal Trade. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–16, 2013.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Schmallenberg virus : State of Art. **EFSA Journal**, v. 12, n. 5, p. 1–54, 2014.

ELBERS, A. R. W.; LOEFFEN, W. L. A.; QUAK, S.; BOER-LUIJTZE, E. De; VAN DER SPEK, A. N.; BOUWSTRA, R.; MAAS, R.; SPIERENBURG, M. A. H.; DE KLUIJVER, E. P.; SCHAIK, G. Van; POEL, W. H. M. Van Der. Seroprevalence of Schmallenberg Virus Antibodies among Dairy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1065–1071, 2012a.

ELBERS, A. R. W.; LOEFFEN, W. L. A.; QUAK, S.; DE BOER-LUIJTZE, E.; VAN DER SPEK, A. N.; BOUWSTRA, R.; MAAS, R.; SPIERENBURG, M. A. H.; DE KLUIJVER, E. P.; VAN SCHAIK, G.; VAN DER POEL, W. H. M. Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1065–1071, 2012b.

ENDALEW, A. D.; FABURAY, B.; WILSON, W. C.; RICHT, A. Schmallenberg Disease — A Newly Emerged Culicoides-Borne Viral Disease of Ruminants such as. **Viruses**, v. 11, n. 1065, p. 1–11, 2019.

ESTEVEZ, F.; MESQUITA, J. R.; ESTEVES, F.; MESQUITA, J. R.; NÓBREGA, C.; SANTOS, C.; MONTEIRO, A. Epidemiology and Emergence of Schmallenberg Virus. In: **Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases - Attributes of Lifestyle and Nature on Humankind**. [s.l.: s.n.]p. 58–71.

ESTEVEZ, F.; MESQUITA, J. R.; VALA, H.; ABREU-SILVA, J.; VAN DER POEL, W. H. M.; NASCIMENTO, M. S. J. Serological Evidence for Schmallenberg Virus Infection in Sheep of Portugal 2014. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 1, p. 63–65, 2016b.

EUR-Lex. European Union law. Diretiva 2004/68/CE do conselho de 26.4.2004. Disponível em < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/TXT/?uri=CELEX:32004L0068> > Acesso em 30 de jan. 2020.

FARIAS, E. D. S.; MARQUES, A.; JÚNIOR, P.; MEDEIROS, J. F.; CLARA, M.; SANTARÉM, A. 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. de S.; ALMEIDA, J. F.; PESSOA, F. A. C. List of Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. **The Journal of Biodiversity Data**, v. 12, n. 6, p. 1–27, 2016.

FERNÁNDEZ-AGUILAR, X.; PUJOLS, J.; VELARDE, R.; ROSELL, R.; LÓPEZ-OLVERA, J. R.; MARCO, I.; PUMAROLA, M.; SEGALÉS, J.; LAVÍN, S.; CABEZÓN, O. Schmallenberg virus circulation in high mountain ecosystem, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1062–1064, 2014.

FERREIRA, C. S. A. S.; VASCONCELOS-N, F. E. R. C. C.; CARDOSO, T. P. L.; VALA, A. C. C. H.; NASCIMENTO, M. S. J.; MESQUITA, J. R. Serologic evidence for Schmallenberg virus circulation at high altitude , Central Portugal , 2015 – 2016. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 6, p. 1553–1556, 2018.

FISCHER, M.; HOFFMANN, B.; GOLLER, K. V.; HÖPER, D.; WERNIKE, K.; BEER, M. A mutation “Hot Spot” in the Schmallenberg virus M segment. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 6, p. 1161–1167, 2013a.

FISCHER, M.; SCHIRRMEIER, H.; WERNIKE, K.; WEGELT, A.; BEER, M.; HOFFMANN, B. Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems. **Virology journal**, v. 10, n. 327, p. 2–9, 2013b.

FLAKE, O.; COUNSELOR, A.; SILVA, J. F.; SPECIALIST, A.; KONG, H. Livestock and Products Semi-annual 2019 Semiannual Livestock. p. 1–14, 2019.

FLETA ZARAGOZANO, J. Schmallenberg disease: Can it affect the human beings? **Medicina Clinica**, v. 150, n. 5, p. 205, 2018.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; FLORES VOGEL, F. S.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil - Histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125–134, 2005.

GACHE, K.; DOMINGUEZ, M.; PELLETIER, C.; PETIT, E.; CALAVAS, D.; HENDRIKX, P.; TOURATIER, A. Schmallenberg virus: A seroprevalence survey in cattle and sheep, France, winter 2011-2012. **Veterinary Record**, v. 173, n. 6, p. 141, 2013.

GACHE, K.; ZIENTARA, S.; COLLIN, E.; AUTHIE, E.; DION, F.; GARIN, E.; ZANELLA, G.; CALAVAS, D. Spatial and temporal patterns of Schmallenberg virus in France in 2016. **The Veterinary record**, n. March, p. 2016–2019, 2018.

GARCÍA-BOCANEGRA, I.; CANO-TERRIZA, D.; VIDAL, G.; ROSELL, R.; PANIAGUA, J.; JIMÉNEZ-RUIZ, S.; EXPÓSITO, C.; RIVERO-JUAREZ, A.; ARENAS, A.; PUJOLS, J. Monitoring of Schmallenberg virus in Spanish wild artiodactyls, 2006-2015. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. 1–12, 2017.

GARIGLIANY, M. M.; BAYROU, C.; KLEIJNEN, D.; CASSART, D.; JOLLY, S.; LINDEN, A.; DESMECHT, D. Schmallenberg virus: A new Shamonda/Sathuperi-like virus on the rise in Europe. **Antiviral Research**, v. 95, n. 2, p. 82–87, 2012a.

GARIGLIANY, M. M.; HOFFMANN, B.; DIVE, M.; SARTELET, A.; BAYROU, C.; CASSART, D.; BEER, M.; DESMECHT, D. Schmallenberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 1005–1006, 2012b.

GERHAUSER, I.; WEIGAND, M.; HAHN, K.; HERDER, V.; WOHLSEIN, P. Lack of Schmallenberg Virus in Ruminant Brain Tissues Archived from 1961 to 2010 in Germany. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 2–3, p. 151–154, 2014.

GLOSTER, J.; MELLOR, P. S.; MANNING, A. J.; WEBSTER, H. N.; HORT, M. C. Assessing the risk of windborne spread of bluetongue in the 2006 outbreak of disease in northern Europe. **Veterinary Record**, v. 160, p. 2006–2008, 2006.

GOFFREDO, M.; MONACO, F.; CAPELLI, G.; QUAGLIA, M.; FEDERICI, V.; CATALANI, M.; MONTARSI, F.; POLCI, A.; PINONI, C.; CALISTRI, P.; SAVINI, G. Schmallenberg virus in Italy: A retrospective survey in Culicoides stored during the bluetongue Italian surveillance program. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 111, n. 3–4, p. 230–236, 2013.

GOLENDER, N.; BUMBAROV, V. Y.; ERSTER, O.; BEER, M.; KHINICH, Y.; WERNIKE, K. Development and validation of a universal S-segment-based real-time RT-PCR assay for the detection of Simbu serogroup viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 261, p. 80–85, 2018.

GOLLER, K. V.; HÖPER, D.; SCHIRRMEIER, H.; METTENLEITER, T. C.; BEER, M. Schmallenberg Virus as Possible Ancestor of Shamonda Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1644–1646, 2012.

GOUZIL, J.; FABLET, A.; LARA, E.; CAIGNARD, G.; COCHET, M.; KUNDLACZ, C.; PALMARINI, M.; VARELA, M.; BREARD, E.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; COULPIER, M.; ZIENTARA, S.; VITOURA, D. Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization *Julie*. **Journal of Virology**, v. 91, n. 1, p. 1–15, 2017.

GUBBINS, S.; RICHARDSON, J.; BAYLIS, M.; WILSON, A. J.; ABRAHANTES, J. C. Modelling the continental-scale spread of Schmallenberg virus in Europe : Approaches and challenges. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 116, n. 4, p. 404–411, 2014.

HAIDER, N.; CUELLAR, A. C.; KJÆR, L. J.; SØRENSEN, J. H.; BØDKER, R. Microclimatic temperatures at Danish cattle farms, 2000–2016: Quantifying the temporal and spatial variation in the transmission potential of Schmallenberg virus. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.

HECHINGER, S.; WERNIKE, K.; BEER, M. Single immunization with an inactivated vaccine protects sheep from Schmallenberg virus infection. **Veterinary Research**, v. 45, n. 79, p. 1–4, 2014.

HEIJDEN, H. M. J. F. Van Der; BOUWSTRA, R. J.; MARS, M. H.; POEL, W. H. M. Van Der; WELLENBERG, G. J.; MAANEN, C. Van. Research in Veterinary Science Development and validation of an indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies against Schmallenberg virus in blood samples from ruminants. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 731–735, 2013.

HELMER, C.; EIBACH, R.; TEGTMEYER, P. C.; HUMANN-ZIEHANK, E.; GANTER, M. Survey of Schmallenberg virus (SBV) infection in German goat flocks. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 11, p. 2335–2345, 2019.

HERDER, V.; WOHLSEIN, P.; PETERS, M.; HANSMANN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallenberg virus in Germany. **Veterinary pathology**, v. 49, n. 4, p. 588–91, 2012.

HOFFMANN, B.; SCHEUCH, M.; HÖPER, D.; JUNGBLUT, R.; HOLSTEG, M.; SCHIRRMIEIER, H.; ESCHBAUMER, M.; GOLLER, K. V.; WERNIKE, K.; FISCHER, M.; BREITHAUPT, A.; METTENLEITER, T. C.; BEER, M. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 469–472, 2012.

HOFFMANN, B.; SCHULZ, C.; BEER, M. First detection of Schmallenberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3–4, p. 289–295, 2013.

HOFMANN, M. A.; MADER, M.; FLU, F.; RENZULLO, S. Genetic stability of Schmallenberg virus in vivo during an epidemic , and in vitro , when passaged in the highly susceptible porcine SK-6 cell line. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1–2, p. 97–108, 2015.

IBGE INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática- SIDRA, 2017. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado> > Acesso em 10 junho 2019.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal 2017. V.45, p.1-8, 2017.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2018b Release. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> > Acesso em: 09 agosto 2019.

ILCHMANN, A.; ARMSTRONG, A. A.; CLAYTON, R. F. Schmallenberg virus, an emerging viral pathogen of cattle and sheep and a potential contaminant of raw materials, is detectable by classical in-vitro adventitious virus assays. **Biologicals**, v. 49, p. 28–32, 2017.

KAMEKE, D.; WERNER, D.; HOFFMANN, B.; LUTZ, W.; KAMPEN, H. Schmallenberg virus in Germany 2011–2014: searching for the vectors. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 527–534, 2016.

KAUFFOLD, J.; VAHLENKAMP, T. W.; HOOPSA, M. Schmallenberg virus in Europe-a review Johannes Kauffold,. **Clinical Theriogenology**, v. 6, n. 3, p. 261–266, 2014.

KĘSIK-MALISZEWSKA, J.; KRZYSIAK, M. K.; GROCHOWSKA, M.; LECHOWSKI, L.; CHASE, C.; LARSKA, M. Epidemiology of Schmallenberg Virus in European Bison (*Bison bonasus*) in Poland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 2, p. 1–11, 2017.

KESIK-MALISZEWSKA, J.; LARSKA, M.; COLLINS, Á. B.; ROLA, J. Post-Epidemic Distribution of Schmallenberg Virus in Culicoides Arbovirus Vectors in Poland. **Viruses**, v. 11, n. 447, p. 1–18, 2019.

KĘSIK-MALISZEWSKA, J.; ANTOS, A.; JERZY, R.; LARKA, M. Comparison of Schmallenberg virus sequences isolated from mammal host and arthropod vector. **Virus Genes**, v. 54, n. 6, p. 792–803, 2018.

KING, B.; O'SHEA BROWN, T.; TARLINTON, R.; DALY, J. M. Seroprevalence of Schmallenberg virus in the United Kingdom and the Republic of Ireland: 2011-2013. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1–2, p. 36–40, 2015.

KÖNIG, P.; WERNIKE, K.; BREITHAUPT, A.; BEER, M. Fetal infection with Schmallenberg virus — An experimental pathogenesis study in pregnant cows. **Transboundary and emerging diseases**, v. 66, p. 454–462, 2018.

KRAATZ, F.; WERNIKE, K.; HECHINGER, S.; KÖNIG, P.; GRANZOW, H.; REIMANN, I.; BEER, M. Deletion Mutants of Schmallenberg Virus Are Avirulent and Protect. **Journal of Virology**, v. 89, n. 3, p. 1825–1837, 2015.

KRAATZ, F.; WERNIKE, K.; REICHE, S.; AEBISCHER, A.; REIMANN, I.; BEER, M. Schmallenberg virus non-structural protein NSm : Intracellular distribution and role of non-hydrophobic domains. v. 516, n. December 2017, p. 46–54, 2018a.

KRAATZ, F.; WERNIKE, K.; REICHE, S.; AEBISCHER, A.; REIMANN, I.; BEER, M. Schmallenberg virus non-structural protein NSm : Intracellular distribution and role of non-hydrophobic domains. **Virology**, v. 516, p. 46–54, 2018b.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONA, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction in Sjo. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

LALOY, E.; BRAUD, C.; BRÉARD, E.; KAANDORP, J.; BOURGEOIS, A.; KOHL, M.; MEYER, G.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; ZIENTARA, S.; CHAI, N. Schmallenberg Virus in Zoo Ruminants , France and the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 2201–2203, 2016.

LALOY, E.; BRÉARD, E.; TRAPP, S.; POZZI, N.; RIOU, M.; BARC, C.; BRETON, S.; DELAUNAY, R.; CORDONNIER, N.; CHATEAU-JOUBERT, S.; CROCHET, D.; GOUZIL, J.; HÉBERT, T.; RAIMBOURG, M.; VIAROUGE, C.; VITOUR, D.; DURAND, B.; PONSART, C.; ZIENTARA, S. Fetopathic effects of experimental Schmallenberg virus infection in pregnant goats. **Veterinary Microbiology**, v. 211, 2017a.

LALOY, E.; BRÉARD, E.; TRAPP, S.; POZZI, N.; RIOU, M.; BARC, C.; BRETON, S.; DELAUNAY, R.; CORDONNIER, N.; CHATEAU-JOUBERT, S.; CROCHET, D.; GOUZIL, J.; HÉBERT, T.; RAIMBOURG, M.; VIAROUGE, C.; VITOUR, D.; DURAND, B.; PONSART, C.; ZIENTARA, S. Fetopathic effects of experimental Schmallenberg virus infection in pregnant goats. **Veterinary Microbiology**, v. 211, p. 141–149, 2017b.

LARSKA, M. Schmallenberg virus : a cyclical problem. **Veterinary Record**, v. 183, n. 22, p. 688–689, 2018.

LARSKA, M.; KRZYSIAK, M. K.; KESIK-MALISZEWSKA, J.; ROLA, J. Cross-sectional study of schmallenberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at the end of the vector season of 2013. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 967, p. 1–7, 2014.

LEASK, R.; BOTHA, A. M.; BATH, G. F. Schmallenberg virus – Is it present in South Africa ? **Clinical Communication**, v. 84, n. 1, p. 1–4, 2012.

- LECHNER, I.; WÜTHRICH, M.; MEYLAN, M.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; SCHÜPBACH-REGULA, G. Association of clinical signs after acute Schmallenberg virus infection with milk production and fertility in Swiss dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 121–129, 2017.
- LIEVAART-PETERSON, K.; LUTTIKHOLT, S.; PEPERKAMP, K.; BROM, R. Van Den; VELLEMA, P. Schmallenberg disease in sheep or goats : Past , present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 181, n. 1–2, p. 147–153, 2015.
- LOEFFEN, W.; QUAK, S.; BOER-LUIJTZE, E. De; HULST, M.; POEL, W. Van Der; BOUWSTRA, R.; MAAS, R. Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallenberg virus and serological results in suspect and infected herds. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 44, p. 1–8, 2012.
- MALMSTEN, A.; MALMSTEN, J.; BLOMQVIST, G.; NÄSLUND, K.; VERNERSSON, C.; HÄGGLUND, S.; DALIN, A. M.; ÅGREN, E. O.; VALARCHER, J. F. Serological testing of Schmallenberg virus in Swedish wild cervids from 2012 to 2016. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 84, p. 1–5, 2017.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União DOU. Instrução Normativa nº10, de 5 de março de 2013. nº 44, Seção 1, p. 4, 2013.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União DOU. Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013, nº192, Seção 1, p. 47, 2013a.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União DOU. Instrução Normativa nº36, de 27 de outubro de 2015. nº 206, Seção 1, p. 3, 2015.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União DOU. Instrução Normativa nº12, de 28 de maio de 2015. nº 101, Seção 1, p. 19, 2015a.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em: 23 abril 2018.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União DOU. Instrução Normativa nº38, de 25 de julho de 2018. nº 147, Seção 1, p. 16, 2018a.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União DOU. Instrução Normativa nº20, de 24 de abril de 2018. nº 89, Seção 1, p. 3, 2018b.
- MARLENE VILLEGAS-SALAS, TARA ALVARADO, CARLA TREJOS-ARAYA, ALEXIS SANDI, BERNAL LEÓN, C. J. Absence of IgG antibodies against Schmallenberg virus in ruminant sera (bovine , goat and sheep) collected in Costa Rica between 2012 and 2014 . **Revista de Ciencias Veterinarias**, v. 35, n. 2, p. 103–112, 2017.
- MARTINELLE, L.; POSKIN, A.; DAL POZZO, F.; DE REGGE, N.; CAY, B.; SAEGERMAN, C. Experimental infection of sheep at 45 and 60 days of gestation with schmallenberg virus readily led to placental colonization without causing congenital malformations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.
- MARTINELLE, L.; POSKIN, A.; POZZO, F. D.; MOSTIN, L.; CAMPE, W. Van; CAY, A.

- B.; REGGE, N. De; SAEGERMAN, C.; SAEGERMAN, C. Three Different Routes of Inoculation for Experimental Infection with Schmallenberg Virus in Sheep. **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, p. 305–308, 2017.
- MATHEW, C.; KLEVAR, S.; ELBERS, A. R. W.; POEL, W. H. M. Van Der; KIRKLAND, P. D.; GODFROID, J.; MDEGELA, R. H.; MWAMENGELE, G.; STOKSTAD, M. Detection of serum neutralizing antibodies to Simbu sero-group viruses in cattle in Tanzania. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 208, p. 1–9, 2015.
- MCGOWAN, S. L.; ROCCA, S. A. La; GRIERSON, S. S.; DASTJERDI, A.; CHOUDHURY, B.; STEINBACH, F. Incursion of Schmallenberg virus into Great Britain in 2011 and emergence of variant sequences in 2016. **The Veterinary Journal**, v. 234, p. 77–84, 2018.
- MCGRATH, G.; MORE, S. J.; NEILL, R. O. Hypothetical route of the introduction of Schmallenberg virus into Ireland using two complementary analyses. **Veterinary Record**, v. 182, n. 8, p. 1–7, 2012.
- MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G. & SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 2219-2224, 1992.
- MÉROC, E.; POSKIN, A.; VAN LOO, H.; VAN DRIESSCHE, E.; CZAPLICKI, G.; QUINET, C.; RIOCREUX, F.; DE REGGE, N.; CAIJ, B.; VAN DEN BERG, T.; HOOYBERGHS, J.; VAN DER STEDE, Y. Follow-up of the Schmallenberg Virus Seroprevalence in Belgian Cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 5, p. e80–e84, 2015.
- MÉROC, E.; REGGE, N. De; RIOCREUX, F.; CAIJ, A. B.; BERG, T. Van Den; STEDE, Y. Van Der. Distribution of Schmallenberg Virus and Seroprevalence in Belgian Sheep and Goats. **Transboundary and emerging diseases**, v. 61, p. 425–431, 2014.
- MOLENAAR, F. M.; ROCCA, S. A. La; KHATRI, M.; LOPEZ, J.; STEINBACH, F.; DASTJERDI, A. Exposure of Asian Elephants and Other Exotic Ungulates to Schmallenberg Virus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–11, 2015.
- MOLINI, U.; DONDONA, A. C.; HILBERT, R.; MONACO, F. Antibodies against Schmallenberg virus detected in cattle in the Otjozondjupa region , Namibia. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 89, n. 0, p. 1–2, 2018.
- MOUCHANTAT, S.; WERNIKE, K.; LUTZ, W.; HOFFMANN, B.; ULRICH, R. G.; BÖRNER, K.; WITTSTATT, U.; BEER, M. A broad spectrum screening of Schmallenberg virus antibodies in wildlife animals in Germany. **Veterinary Research**, v. 46, n. 99, p. 1–5, 2015.
- OIE. World Organisation for Animal Health. In: **OIE Technical Factsheet**, 2017. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf> Acesso em: 17 junho 2019.
- OIE. World Organisation for Animal Health. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2012. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>> Acesso em: 30 mai. 2019.

OIE, W. World Organisation for Animal Health. In: Schmallenberg Virus. **Oie Technical Factsheet**, p. 1–6, 2013.

PAGÈS, N.; TALAVERA, S.; VERDUN, M.; PUJOL, N.; VALLE, M.; BENSALD, A.; PUJOLS, J. Schmallenberg virus detection in *Culicoides* biting midges in Spain : First laboratory evidence for highly efficient infection of *Culicoides* of the *Obsoletus* complex and *Culicoides imicola* s. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 1, p. 1–6, 2018.

PAWAIYA, R. V. S. GUPTA, V. K. A review on Schmallenberg virus infection: a newly emerging disease of cattle, sheep and goats. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 10, p. 516–526, 2013.

PEJAKOVIĆ, S.; WIGGERS, L.; COUPEAU, D.; KIRSCHVINK, N.; MASON, J.; MUYLKENS, B. Test selection for antibody detection according to the seroprevalence level of Schmallenberg virus in sheep. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–16, 2018.

PEPERKAMP, N. H.; LUTTIKHOLT, S. J.; DIJKMAN, R.; VOS, J. H.; JUNKER, K.; GREIJ DANUS, S.; ROUMEN, M. P.; GARDEREN, E. van; MEERTENS, N.; MAANEN, C. van; LIEVAART, K.; WUYCKHUISE, L. van; WOU DA, W. Ovine and Bovine Congenital Abnormalities Associated With Intrauterine Infection With Schmallenberg Virus. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1057–1066, 2015.

POSKIN, A.; CAMPE, W. Van; MOSTIN, L.; CAY, B.; REGGE, N. De. Experimental Schmallenberg virus infection of pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 3–4, p. 398–402, 2014.

POSKIN, A.; LOO, H. Van; QUINET, C.; DRIESSCHE, E. Van; DELOOZ, L.; BEHAEGHEL, I. Large-Scale Cross-Sectional Serological Survey of Schmallenberg Virus in Belgian Cattle at the End of the First Vector Season. **Transboundary and emerging diseases**, v. 60, p. 4–8, 2013.

POSKIN, A.; MARTINELLE, L.; STEDE, Y. Van Der; SAEGERMAN, C.; CAY, B.; REGGE, N. De. Genetically stable infectious Schmallenberg virus persists in foetal envelopes of pregnant ewes. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1630, p. 1630–1635, 2017.

POSKIN, A.; THÉRON, L.; HANON, J.; SAEGERMAN, C.; VERVAEKE, M.; STEDE, Y. Van Der; CAY, B.; REGGE, N. De. Reconstruction of the Schmallenberg virus epidemic in Belgium : Complementary use of disease surveillance approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 183, p. 50–61, 2016.

RASEKH, M.; SARANI, A.; HASHEMI, S. H. Detection of Schmallenberg virus antibody in equine population of Northern and Northeast of Iran. **Veterinary World**, v. 11, n. 1, p. 30–33, 2018.

RASMUSSEN, L. D.; KIRKEBY, C.; BØDKER, R.; KRISTENSEN, B.; RASMUSSEN, T. B.; BELSHAM, G. J.; BØTNER, A. Rapid Spread of Schmallenberg Virus-infected Biting Midges (*Culicoides* spp.) across Denmark in 2012. **Transboundary and emerging diseases**, v. 61, p. 12–16, 2014.

RASMUSSEN, L. D.; KRISTENSEN, B.; KIRKEBY, C.; RASMUSSEN, T. B.; BELSHAM, G. J.; BØDKER, R.; BØTNER, A. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1204–1206, 2012.

REGGE, N. De; DEBLAUWE, I.; DEKEN, R. De; VANTIEGHEM, P.; MADDER, M.; GEYSEN, D.; SMEETS, F. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. **Transboundary and emerging diseases**, v. 59, p. 471–475, 2012.

REUSKEN, C.; VAN DEN WIJNGAARD, C.; VAN BEEK, P.; BEER, M.; BOUWSTRA, R.; GODEKE, G. J.; ISKEN, L.; VAN DEN KERKHOFF, H.; VAN PELT, W.; VAN DER POEL, W.; REIMERINK, J.; SCHIELEN, P.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; VELLEMA, P.; DE VRIES, A.; WOUTERS, I.; KOOPMANS, M. Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1746–1754, 2012.

RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R.; A.; A. Doenças de ruminantes e equinos. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

ROSSI, S.; VIAROUGE, C.; FAURE, E.; GACHE, K.; GIBERT, P.; VERHEYDEN, H.; HARS, J.; KLEIN, F.; MAILLARD, D.; GAUTHIER, D.; GAME, Y.; POZET, F.; SAILLEAU, C.; GARNIER, A.; ZIENTARA, S.; BRÉARD, E. Exposure of Wildlife to the Schmallenberg Virus in France (2011 – 2014): Higher , Faster , Stronger (than Bluetongue)! **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, p. 354–363, 2017.

ROTOLO, M. L.; MAIN, R. G.; ZIMMERMAN, J. J. Herd-level infectious disease surveillance of livestock populations using aggregate samples. **Animal Health Research Reviews**, v. 19, n. 1, p. 53–64, 2018.

SAILLEAU, C.; BOOGAERTS, C.; MEYRUEIX, A.; LALOY, E.; BRÉARD, E.; VIAROUGE, C.; DESPRAT, A.; VITOUR, D.; DOCEUL, V.; BOUCHER, C.; ZIENTARA, S.; NICOLIER, A.; GRANDJEAN, D. Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1896–1898, 2013.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR – Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.1, p. 23-27, 2004.

SCHULZ, C.; BEER, M.; HOFFMANN, B. Schmallenberg virus infection in South American camelids : Field and experimental investigations. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 3–4, p. 171–179, 2015.

SCHULZ, C.; POEL, W. H. M. van der; PONSART, C.; CAY, A. B.; STEINBACH, F.; ZIENTARA, S.; BEER, M.; HOFFMANN, B. European interlaboratory comparison of Schmallenberg virus (SBV) real-time RT-PCR detection in experimental and field samples: The method of extraction is critical for SBV RNA detection in semen. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 4, p. 422–430, 2015.

SEDDA, L.; ROGERS, D. J. The influence of the wind in the Schmallenberg virus outbreak in Europe. **Scientific Reports**, v. 3, n. 3361, p. 1–8, 2013.

SIBHAT, B.; AYELET, G.; GEBREMEDHIN, E. Z.; SKJERVE, E.; ASMARE, K. Seroprevalence of Schmallenberg virus in dairy cattle in Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 178, p. 61–67, 2018.

SICK, F.; BEER, M.; KAMPEN, H.; WERNIKE, K. *Culicoides* Biting Midges — Underestimated Vectors for Arboviruses of Public Health and Veterinary Importance.

Viruses, v. 11, n. 376, p. 1–19, 2019.

SOHIER, C.; MICHIELS, R.; KAPPS, E.; VAN MAEL, E.; QUINET, C.; CAY, A. B.; DE REGGE, N. Unchanged Schmallenberg virus seroprevalence in the Belgian sheep population after the vector season of 2014 and 2015 despite evidence of virus circulation. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 177–180, 2017.

SONGER, J.G.; POST, K. W. *Veterinary microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Ed Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2005, 434p.

STAVROU, A.; DALY, J. M.; MADDISON, B.; GOUGH, K.; TARLINTON, R. How is Europe positioned for a re-emergence of Schmallenberg virus? **Veterinary Journal**, v. 230, p. 45–51, 2017.

STEINRIGL, A.; SCHIEFER, P.; SCHLEICHER, C.; PEINHOPF, W.; WODAK, E.; BAGÓ, Z.; SCHMOLL, F. Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 116, n. 4, p. 350–359, 2014.

STOKES, J. E.; TARLINTON, R. E.; LOVATT, F.; BAYLIS, M.; CARSON, A.; DUNCAN, J. S. Survey to determine the farm-level impact of Schmallenberg virus during the 2016 – 2017 United Kingdom lambing season. **Veterinary Record**, v. 183, n. 22, p. 1–10, 2017.

SUDHAKAR, S. B.; GANDHAL, P. N.; SINGH, F.; RAUT, A. A.; MISHRA, A.; KULKARNI, D. D.; SINGH, V. P. **Emerging and Transboundary Animal Viruses. Chapter 10 Schmallenberg Virus**. [s.l: s.n.]

SZEREDI, L.; DAN, A.; MALIK, P.; JANOSI, S.; HORNYAK, A. Low incidence of Schmallenberg virus infection in natural cases of abortion in domestic ruminants in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 68, n. 1, p. 1–7, 2020.

TAKKEN, W.; VERHULST, N.; SCHOLTE, E.; JACOBS, F.; JONGEMA, Y.; LAMMEREN, R. Van. The phenology and population dynamics of *Culicoides* spp . in different ecosystems in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 41–54, 2008.

TARLINTON, R.; DALY, J.; DUNHAM, S.; KYDD, J. The challenge of Schmallenberg virus emergence in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 10–18, 2012.

THRUSFIELD, M. V. *Epidemiologia veterinária*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2004.

TIWARI, A.; SHUKLA, P.; GUPTA, D.; SINGH, B.; RAIKWAR, A.; SHEIKH, A. A.; BHAGAT, R. Schmallenberg virus infection : An emerging vector borne disease. **International Journal of Chemical**, v. 6, n. 2, p. 2615–2619, 2018.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Schmallenberg Virus Standard Operating Procedures : 1 . Overview of Etiology and Ecology National. **Preparedness and Incident Coordination Center**. v. 1, n. February, 2014.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. National Agricultural Statistics Service. Disponível em: < <https://www.nass.usda.gov/AgCensus/index.php> > Acesso em 10 junho 2019.

- VARELA, M.; SCHNETTLER, E.; CAPORALE, M.; MURGIA, C.; BARRY, G.; MCFARLANE, M.; MCGREGOR, E.; PIRAS, I. M.; SHAW, A.; LAMM, C.; JANOWICZ, A.; BEER, M.; GLASS, M.; HERDER, V.; HAHN, K.; BAUMGÄRTNER, W.; KOHL, A.; PALMARINI, M. Schmallenberg Virus Pathogenesis, Tropism and Interaction with the Innate Immune System of the Host. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2013.
- VELDHUIS, A.; MARS, J.; STEGEMAN, A.; SCHAİK, G. Van. Changing surveillance objectives during the different phases of an emerging vector-borne disease outbreak : The Schmallenberg virus example. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 166, p. 21–27, 2019.
- VENTER, G. J.; BOIKANYO, S. N. B.; BEER, C. J. De. The influence of temperature and humidity on the flight activity of *Culicoides imicola* both under laboratory and field conditions. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2019.
- WENSMAN, J. J.; BLOMQVIST, G.; HJORT, M.; HOLST, B. S. Presence of antibodies to schmallenberg virus in a dog in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2802–2803, 2013.
- WERNIKE, K.; AEBISCHER, A.; ROMAN-SOSA, G.; BEER, M. The N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc is highly immunogenic and can provide protection from infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42500, p. 1–10, 2017.
- WERNIKE, K.; BEER, M. Misinterpretation of Schmallenberg virus sequence variations : the sample material makes the difference. **Virus Genes**, v. 54, n. 6, p. 792–803, 2018.
- WERNIKE, K.; BEER, M. International proficiency trial demonstrates reliable Schmallenberg virus infection diagnosis in endemic and non-affected countries. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–11, 2019.
- WERNIKE, K.; BEER, M. Re-circulation of Schmallenberg virus , Germany , 2019. **Transboundary and emerging diseases**, n. January, p. 1–6, 2020.
- WERNIKE, K.; BEER, M.; HOFFMANN, B. Schmallenberg Virus Infection Diagnosis: Results of a German Proficiency Trial. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. 1405–1410, 2016.
- WERNIKE, K.; BEER, M.; HOFFMANN, B. Schmallenberg Virus Infection Diagnosis : Results of a German Proficiency Trial. **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, p. 1405–1410, 2017.
- WERNIKE, K.; BROCCHI, E.; CORDIOLI, P.; SÉNÉCHAL, Y.; SCHELP, C.; WEGELT, A.; AEBISCHER, A.; ROMAN-SOSA, G.; REIMANN, I.; BEER, M. A novel panel of monoclonal antibodies against Schmallenberg virus nucleoprotein and glycoprotein Gc allows specific orthobunyavirus detection and reveals antigenic differences. **Veterinary Research**, v. 46, n. 27, p. 2–12, 2015a.
- WERNIKE, K.; CONRATHS, F.; ZANELLA, G.; GRANZOW, H.; GACHE, K.; SCHIRRMIEIER, H.; VALAS, S.; STAUBACH, C.; MARIANNEAU, P.; KRAATZ, F.; HÖRETH-BÖNTGEN, D.; REIMANN, I.; ZIENTARA, S.; BEER, M. Schmallenberg virus- Two years of experiences. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 116, n. 4, p. 423–434, 2014.
- WERNIKE, K.; ELBERS, A.; BEER, M. Schmallenberg virus infection. **Revue Scientifique**

et **Technique Office International Des Epizooties**, v. 34, n. 2, p. 363–373, 2015.

WERNIKE, K.; ESCHBAUMER, M.; SCHIRRMEIER, H.; BLOHM, U.; BREITHAUPT, A.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 1–2, p. 155–159, 2013a.

WERNIKE, K.; HOFFMANN, B.; CONRATHS, F. J.; BEER, M. Schmallenberg virus recurrence, Germany, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 7, p. 1202–1204, 2015b.

WERNIKE, K.; HOLSTEG, M.; SZILLAT, K. P.; BEER, M. Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallenberg virus in naturally infected cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 368, p. 1–6, 2018.

WERNIKE, K.; NIKOLIN, V. M.; HECHINGER, S.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 35, p. 3558–3563, 2013b.

WISLØFF, H.; NORDVIK, B. S.; SVILAND, S.; TØNNESEN, R. Short Communication First documented clinical case of Schmallenberg virus in Norway : fetal malformations in a calf. **Veterinary Record**, v. 174, n. 5, p. 8–9, 2014.

WTO. WORD TARDE ORGANIZATION. Sanitary and Phytosanitary Information Management System- G/SPS/N/BRA/798 e G/SPS/N/BRA/798Add.1. Disponível em <<http://spsims.wto.org/en/EmergencyNotifications/View/129454?FromAllNotifications=True>> Acesso em: 09 de out. 2019.

WÜTHRICH, M.; LECHNER, I.; AEBI, M.; VÖGTLIN, A.; POSTHAUS, H.; SCHÜPBACH-REGULA, G.; MEYLAN, M. A case-control study to estimate the effects of acute clinical infection with the Schmallenberg virus on milk yield, fertility and veterinary costs in Swiss dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 126, p. 54–65, 2016.

YANASE, T.; FUKUTOMI, T.; YOSHIDA, K.; KATO, T.; OHASHI, S.; YAMAKAWA, M.; TSUDA, T. The emergence in Japan of Sathuperi virus , a tropical Simbu serogroup virus of the genus Orthobunyavirus Brief Report. **Archives of Virology**, v. 149, p. 1007–1013, 2004.

YILDIRIM, A.; DIK, B.; DUZLU, O.; ONDER, Z.; CILOGLU, A.; YETISMISA, G.; INCI, A. Genetic diversity of Culicoides species within the Pulicaris complex (Diptera : Ceratopogonidae) in Turkey inferred from mitochondrial COI gene sequences. **Acta Tropica**, v. 190, p. 380–388, 2019.

ZEYNALOVA, S. Biosurveillance study of Schmallenberg disease in Azerbaijan in 2012-2017. **Journal of Public Health Informatics**, v. 11, n. 1, p. 12917, 2019.

ZHAI, S. L.; LV, D. H.; WEN, X. H.; ZHU, X. L.; YANG, Y. Q.; CHEN, Q. L.; WEI, W. K. Preliminary serological evidence for Schmallenberg virus infection in China. **Tropical Animal Health and Production**, n. 21, p. 1–5, 2017.