

Marina Monteiro



MONITORIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgG CONTRA O VIRUS DA LINGUA AZUL EM OVELHAS SERRA DA ESTRELA EM QUATRO CONCELHOS DA BEIRA INTERIOR

IPV - ESTGV | 2017

Instituto Politécnico de Viseu
Escola Superior Agrária de Viseu

Marina Margarida Alves Monteiro

MONITORIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgG CONTRA O VIRUS
DA LINGUA AZUL EM OVELHAS SERRA DA ESTRELA EM
QUATRO CONCELHOS DA BEIRA INTERIOR

TRABALHO DE PROJETO
Mestrado em Tecnologias da Produção Animal

agosto, 2017

Marina Margarida Alves Monteiro

MONITORIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgG CONTRA O VIRUS
DA LINGUA AZUL EM OVELHAS SERRA DA ESTRELA EM
QUATRO CONCELHOS DA BEIRA INTERIOR

TRABALHO DE PROJETO

Mestrado em Tecnologias da Produção Animal

Trabalho efetuado sob orientação:

Orientador: Fernando Esteves

Co-orientador: João Mesquita

Co-orientador: António Monteiro

agosto, 2017



Orientador

Co-orientador

Co-orientador

“As doutrinas expressas são da exclusiva responsabilidade do autor”

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu irmão, porque sem eles não seria possível concluir mais uma etapa.

Ao meu orientador, Professor Fernando Esteves, mais uma vez pela paciência e disponibilidade na elaboração de outro projeto, neste caso ao nível do mestrado.

Ao Professor Doutor João Mesquita sobretudo pela paciência e, pelo auxílio precioso no processamento das amostras obtidas e na análise de resultados.

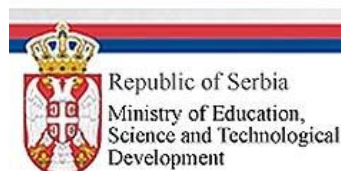
Ao Professor Doutor António Monteiro pela colaboração na aquisição dos *kits* comerciais para aplicação do teste ELISA.

À ANCOSE por todas as informações cedidas, nomeadamente a disponibilização do número de criadores inscritos para a campanha de contraste leiteiro no alavão 2015/2016, assim como informações sobre a produção leiteira de cada animal.

À Professora Catedrática Maria de São José Garcia Alexandre, pela sua disponibilidade e pela cedência do Laboratório de Virologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, do qual é diretora.

A todos os produtores que abriram as portas das suas explorações e que se mostraram dispostos a alterar as suas rotinas para me receber e coletar todas as amostras.

Ao Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde (CI&DETS/IPV) por financiamento do projeto rumDISEASE (PROJ/CI&DETS/2016/0023), e ao consórcio Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde e Caixa Geral de Depósitos (CI&DETS/CGD) pelo financiamento do projeto SBMERGE (PROJ/CI&DETS/CGD/009) e projeto HEALTHY-ValorWhey (PROJ/CI&DETS/CGD/007). Este trabalho foi suportado por fundos da União Europeia (QREN/FEDER) no projeto Ovislab ICT-2013-05-004-5314 ID-64757 e por fundos da Cooperação Transnacional Portugal-Serbia (Fundação para a Ciência e a



Tecnologia / Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia) no projeto SBVEPS.

E, a todos aqueles que de uma forma ou de outra, não foram enumerados, mas que contribuíram para a recolha de amostras e a elaboração do presente documento.

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

A Língua Azul ou Febre Catarral Ovina é uma doença viral transmitida por artrópodes, nomeadamente mosquitos do género *Culicoides*, que afeta ruminantes com maior ou menor virulência, dependendo de diversos fatores (Kyriakis, *et al.*, 2015; Spedicato, 2016). A Língua Azul foi reconhecida há mais de 100 anos na África do Sul, sendo considerada enzoótica em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, no entanto, têm sido descritas alterações regionais drásticas recentes na distribuição global do vírus de Língua Azul, sobretudo na Europa, desde 1998 (Maclachlan, 2011). Assim, no presente trabalho são apresentados os resultados de um estudo sobre a monitorização de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul em Ovelhas Serra da Estrela, em quatro concelhos da Beira Interior: Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Seia e Gouveia, em Fevereiro e Junho de 2016. Para tal, foram visitadas 56 explorações, num total de 105 amostras de leite do tanque e ainda 27 explorações, para recolha de um total de 204 amostras de sangue por punção da veia jugular, por centrifugação foi obtido o lacto-soro e o soro. Posteriormente, foi aplicado um teste de ELISA, com recurso a dois *kits* comerciais ID Screen® BlueTongue Milk Indirect e ID Screen® BlueTongue Competition para a deteção de anticorpos contra a proteína VP7 do vírus de Língua Azul. Nos resultados obtidos, constatou-se, um aumento da prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, relativamente às amostras de leite do primeiro momento, para o segundo momento de 91,07% para 93,88%, respetivamente, o que pode sugerir a emergência do vírus. E registou-se ainda, no que se refere às amostras de sangue uma diminuição da seroprevalência de 4,63% para 3,13%, respetivamente em Fevereiro e Junho de 2016, o que pode sugerir uma diminuição do alcance do vetor.

PALAVRAS-CHAVE: Ovinos, Arbovírus, Língua Azul, Anticorpos, teste ELISA

TITLE, ABSTRACT E KEYWORDS

The BlueTongue or Catarrhal Fever Ovine is a viral disease transmitted by arthropods, namely midges of the genus *Culicoides*, which affects ruminants with greater or lesser virulence depending on several factors (Kyriakis, *et al.*, 2015; Spedicato, 2016). The BlueTongue has been recognized has more than 100 years in South Africa and is considered enzootic in all the tropical and temperate regions of the world, however, recent drastic regional changes have been described in the global distribution of Bluetongue virus, especially in Europe, since 1998 (Maclachlan, 2011). Therefore, in this work, are presented the results of a study about monitoring of IgG antibodies against Bluetongue virus in Ovinos Serra da Estrela in four municipalities of Beira Interior: Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Seia e Gouveia, in February and June of 2016. For this purpose, 56 farms were visited, in a total of 105 milk samples from the tank and 27 farms, to collect a total of 204 samples of blood by puncture of the jugular vein, by centrifugation the lacto-serum and the serum were obtained. Posteriorly, an ELISA test was applied using two commercial ID Screen® BlueTongue Milk Indirect and ID Screen® BlueTongue Competition kits for the detection of antibodies against the BlueTongue virus VP7 protein. In the obtained results, an increase in the prevalence of IgG antibodies against the BlueTongue virus was detected in relation to the milk samples from the first moment, for the second moment of 91.07% and 93.88%, respectively. May suggest the emergence of the virus. And a decrease in seroprevalence from 4.63% to 3.13% was recorded for blood samples, respectively in February and June 2016, which may suggest a decrease in the vector range.

KEY WORDS: Sheep, Arbovirus, BlueTongue, Antibodies, ELISA test

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO E PALAVRAS-CHAVE	vi
TITLE, ABSTRAT E KEYWORDS	vii
ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE QUADROS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. CARACTERIZAÇÃO DA LÍNGUA AZUL	4
2.1. ETIOLOGIA.....	4
2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	5
2.2.1. <i>DISTRIBUIÇÃO</i>	5
2.2.2. <i>TRANSMISSÃO/VECTORES</i>	8
2.3. PATOGENIA	10
2.3.1. <i>SINAIS CLÍNICOS</i>	10
2.4. DIAGNÓSTICO	11
2.5. TRATAMENTO E PROFILAXIA	13
2.5.1. <i>TRATAMENTO</i>	13
2.5.2. <i>PROFILAXIA MÉDICA</i>	14
2.5.3. <i>PROFILAXIA SANITÁRIA</i>	15
2.6. CONTROLO E ERRADICAÇÃO DA DOENÇA	16
3. A LÍNGUA AZUL EM PORTUGAL	18
3.1.1. <i>SEROTIPO 1</i>	18
3.1.2. <i>SEROTIPO 4</i>	19
4. PARTE PRÁTICA	22
4.1. DEFINIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO – QUATRO CONCELHOS DA BEIRA INTERIOR	22
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.2.1. <i>RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS</i>	24
4.2.2. <i>TRABALHO LABORATORIAL</i>	26
4.2.3. <i>MÉTODO ESTATÍSTICO UTILIZADO</i>	29
4.3. RESULTADOS	29
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	40
7. BIBLIOGRAFIA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos segmentos de RNA e das proteínas estruturais que caracterizam o vírus de Língua Azul. Retirado de Schwartz-Cornil, <i>et al.</i> 2008 in Kyriakis, <i>et al.</i> , 2015.....	5
Figura 2. Distribuição mundial dos diversos serotipos de Língua Azul, assim como das principais espécies de culicídeos que transmitem o vírus de Língua Azul. Retirado de Rodrigues 2008, após ser adaptado de MacLachlan & Osburn, 2006.....	6
Figura 3. Possíveis rotas de entrada dos diversos serotipos do vírus de Língua Azul, na Europa desde 1998 até 2008 (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008).	7
Figura 4. Zonas restritas, de acordo com o serotipo em circulação, em toda a Europa em Fevereiro de 2017. Portugal apresenta para todo o território continental a circulação do serotipo 1 e na região do Algarve, o 1 e o 4 (European Commission, 2017).	8
Figura 5. Exemplar de uma fêmea grávida, do género <i>Culicoides</i> , recolhida de um local próximo de alguns focos de Língua Azul, na Bélgica em 2006. Retirado de Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008.....	10
Figura 6. Exemplo de ovino com língua edemaciada, verificando-se a cianose da mesma, aspeto que originou o nome da doença, Língua Azul (Nogueira, <i>et al.</i> , 2007).....	11
Figura 7. Exemplo de armadilhas para captura de culicídeos e do local aconselhável de instalação na exploração. Retirado de Rodrigues, 2008.	16
Figura 8. Representação da área de estudo: os quatro concelhos selecionados da Beira Interior (Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Seia e Gouveia).	23
Figura 9. Colheita das amostra de sangue, por punção da veia jugular.....	25
Figura 10. Exemplo dos tubos utilizados para recolha das amostras de sangue e de leite.....	26
Figura 11. Organização/ disposição das amostras, numa placa exemplificativa da placa do teste de ELISA, numa fase prévia ao mesmo, a fim de facilitar a identificação das amostras com o resultado obtido.	28
Figura 12. Representação de algumas das etapas na aplicação do teste ID Screen® Bluetongue Milk Indirect, nas amostras de lacto-soro.....	28
Figura 13. Representação de algumas das etapas na aplicação do teste ID Screen® Bluetongue Competition, nas amostras de soro de sangue.	29
Figura 14. À esquerda, número de explorações visitadas para colheita de amostras de leite, por concelho. À direita, apresenta-se o número de amostras de leite positivas, nos dois momentos, Fevereiro e Junho de 2016, nos diversos concelhos que constituem a área de estudo.....	34
Figura 15. À esquerda, número de explorações visitadas para colheita de amostras de sangue, por concelho. À direita, apresenta-se o número de amostras de leite positivas, nos dois momentos, Fevereiro e Junho de 2016, nos diversos concelhos que constituem a área de estudo.....	35

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Concelhos e respetivas freguesias, onde é obrigatória a vacinação contra o serotipo 1 do vírus da língua azul, mediante a primeira vacinação ou revacinação anual com vacina inativada, do efetivo ovino reprodutor adulto e dos jovens destinados à reprodução a partir dos 6 meses de idade. Retirado de Edital n.º 43 da Língua Azul (2017).	20
Quadro 2. Discriminação do número de amostras recolhidas em Fevereiro e Junho de 2016. Está representado, quer o número total de explorações por concelho usadas para recolha de cada tipo de amostra (leite e sangue), quer o número de amostras de leite e o número de amostras de sangue, recolhido nos dois momentos, Fevereiro e Junho de 2016.....	24
Quadro 3. Prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul nas amostras de soro de leite, nos dois momentos de recolha (o número total de explorações visitadas é igual ao número de amostras de leite recolhidas, pois em cada exploração foi recolhida apenas uma amostra de leite do tanque).....	30
Quadro 4. Seroprevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul nas amostras de soro de sangue, nos dois momentos de recolha. Está ainda discriminado o número de explorações e o número de animais afetado (em cada exploração visitada para colheita de amostras de sangue, foram recolhidas quatro amostras de sangue, isto é, foi recolhido sangue de quatro animais)....	31
Quadro 5. Prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, nos dois momentos de recolha e para ambas as amostras biológicas, discriminado pelos quatro concelhos da área de estudo.....	34

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por arbovírus são doenças epizooticas de etiologia viral que afetam os ruminantes, com transmissão vetorial, muitas delas incluídas na lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). São, também, consideradas doenças economicamente importantes e com características de emergência e re-emergência em Portugal, e em especial na região centro, nos últimos 10 anos, resultando em elevada morbidade e mortalidade (DGAV, 2014; Kyriakis, *et al.*, 2015).

A Língua Azul é umas dessas doenças com carácter de reporte obrigatório (DGAV, 2014), tendo sido relatada pela primeira vez na África do Sul, no fim do século dezanove (Spreull, 1902 e Spreull, 1905 *in* Kyriakis, *et al.*, 2015) e até à primeira metade do século vinte era apenas considerada endémica em algumas zonas de África e de Chipre (Kyriakis, *et al.*, 2015).

No entanto, desde essa época foram reportados diversos surtos em diferentes zonas do planeta, causados por distintos serotipos da doença. Alguns desses casos, foram por exemplo relatados na Europa, como o surto de 2006 a 2008, com o serotipo 8 ou na Grécia, em 2014 com uma estirpe do serotipo 4. Nestes dois exemplos, foram aplicados planos vacinais mas tardiamente, o que resultou na ampla disseminação da doença, culminando em perdas económicas significativas nas regiões afetadas (Kyriakis, *et al.*, 2015). Em Portugal, encontram-se atualmente em circulação apenas dois serotipos, serotipo 1 em todo o território continental e o serotipo 4 na região do Algarve (DGAV, 2014; DGAV, 2017; European Commission, 2017). Nos últimos anos, têm também surgido novos casos, mais concretamente na zona centro e sul do país (Cordeiro de Sá, 2017; DGAV, 2017), o que justifica a elaboração de trabalhos de monitorização e vigilância epidemiológica no território nacional, pela necessidade de obter dados indicativos da prevalência/incidência deste arbovírus.

Assim, no presente Trabalho de Projeto integrado no Mestrado de Tecnologias da Produção Animal são apresentados os resultados de um estudo sobre a prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, realizado nos ovinos da raça autóctone Serra da Estrela, que iniciaram a campanha de contraste leiteiro no alavão 2015/2016 e que pertencem a quatro concelhos da Beira Interior, nomeadamente Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Seia e Gouveia.

Contudo, este tipo de estudos com atividade no campo revela sempre algumas dificuldades que depois se repercutem nos resultados. Pelo que, este trabalho de projeto não foi exceção, sendo elas: a recetividade por parte dos produtores, ou seja, na abertura das portas das suas explorações, para um “pessoa desconhecida” recolher amostras de leite e, ainda, mais de sangue, o que implica a ação direta sobre os próprios animais e acima de tudo convencer os próprios produtores de que não pertencemos a nenhuma entidade fiscalizadora como ASAE, que não vimos realizar as habituais análises à constituição do leite, mas sim, apenas recolher algumas amostras para um trabalho de fim de curso; as próprias deslocções no terreno com um veículo adequado à cidade, a pé também seria possível, mas devido ao limite de tempo para visitar o maior número de explorações, num mesmo dia, a fim de evitar um maior número de deslocções e abastecimentos e por conseguinte de investimento, antes das ovelhas saírem para o pasto (uma vez que na mesma zona, todos praticam os mesmos horários (Inverno – manhã: 8h a 10h; tarde 16h30-18h; Verão – manhã, 5h30/6h-8h; tarde 19h-20h30) revelou-se outra condicionante; assim como a falta de rede para contactar com os produtores na chegada a algumas explorações, só para confirmar se estaríamos a chegar ao local pretendido; ou a falta de iluminação em algumas explorações, para localizar a veia jugular de uma ovelha, por exemplo numa ovelha de cor preta; já para não falar das condições climatéricas ou dos naturais imprevistos que esperamos que nunca aconteçam, mas que invariavelmente acabam por acontecer, como aquele produtor que se esqueceu que iríamos visita-lo naquele dia.

Claro, todos estes contratempos num primeiro momento, na segunda recolha, contudo, esperamos que seja mais simples, já com dias de sol e temperatura mais agradável logo pela manhã; já conhecemos o percurso a percorrer para chegar a cada exploração e o próprio produtor já sabe qual o procedimento, pelo que não se espera que os produtores (sendo alertados na primeira recolha que iríamos visita-los uma segunda vez para recolha do leite e de sangue das mesmas quatro ovelhas) não demonstrem “paciência” termo utilizado por alguns, para identificar essas ovelhas ou que percamos uma hora à procura dessas quatro ovelhas numa exploração de 150 animais, quando foi tão rápida a primeira recolha.

Contudo, apesar da redução do universo inicial de explorações a visitar e da perda de algumas amostras do primeiro momento para o segundo momento, foi possível a elaboração deste documento. Assim e para concluir, numa primeira fase é

apresentada uma revisão bibliográfica sobre a doença (etiologia, epidemiologia, patogenia, entre outros aspetos) e numa segunda fase, é descrito todo o trabalho de campo realizado desde o primeiro contacto com os produtores à recolha final das amostras de leite e de sangue, assim como o seu processamento e posterior análise, com aplicação do teste ELISA de competição sobre o soro de sangue e do teste ELISA indireto sobre o lacto-soro, no Laboratório de Virologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e a discussão dos resultados obtidos.

2. CARACTERIZAÇÃO DA LÍNGUA AZUL

2.1. ETIOLOGIA

A Língua Azul é uma doença infecciosa, não contagiosa, sem potencial zoonótico, a qual afeta ruminantes domésticos e selvagens, mas sobretudo algumas raças de ovinos (Zientara, *et al.*, 2014).

O agente causal é um arbovírus do género *Orbivirus* e da família *Reoviridae*, transmitido, tal como o nome sugere, por artrópodes, neste caso, por mosquitos do género *Culicoides* (Maan, *et al.*, 2015; Kyriakis, *et al.*, 2015; Spedicato, 2016).

O genoma do vírus de Língua Azul é caracterizado por uma cadeia dupla de RNA dividida em cerca de 10 segmentos independentes, que codificam sete proteínas estruturais (normalmente designadas VP1 a VP7) e quatro não estruturais (designadas por NS1 a NS4) (Figura 1). Este tipo de arbovírus não apresenta envelope, replica-se no citoplasma e apresenta um período de incubação de 5 a 10 dias (Hoffmann, *et al.*, 2008; Maan, *et al.*, 2011; DGAV, 2014).

Devido a estas características, exhibe resistência a agentes físicos e químicos, como por exemplo a solventes orgânicos (clorofórmio e éter) e a desinfetantes (Nonidet P-40, desoxicolato e saponina) e é muito estável em presença de proteínas, tendo resistido durante anos em sangue conservado a 20°C. Contudo, apresenta sensibilidade a pH menor que 6 e pH superior a 8 e a congelação lenta entre -10 e -20°C, podendo ser inativado durante a exposição a temperaturas de 50°C, durante 3 horas ou a 60°C durante cerca de 15 minutos e por produtos químicos e desinfetantes (a β -propiolactona, os iodóforos ou os compostos fenólicos) (DGAV, 2012; OIE, 2013; DGAV, 2014).

Até ao momento, foram descritos 27 serotipos sem imunidade cruzada entre si (DGAV, 2017). Esta variabilidade genética entre os serotipos prende-se com fenómenos de deriva genética e de mutação, sendo que esta última resulta de um rearranjo dos segmentos dos genes do vírus, aquando da infeção com múltiplos serotipos, quer no hospedeiro vertebrado quer no invertebrado (Bonneau & MacLachlan, 2004).

Em Fevereiro de 2010, foi descoberto o serotipo número 26, isolado em ovelhas e cabras que apresentavam sintomas consistentes com a doença, na região de Abdali no Kuwait, perto da fronteira com o Iraque. Foi demonstrada a positividade

das amostras de soro a anticorpos contra o vírus através da aplicação de um teste ELISA (Maan, *et al.*, 2011).

Já no final de 2013, durante uma campanha de vacinação contra o serotipo 1, na Córsega, França, e no decorrer de um processo de monitorização foram recolhidas amostras em cabras assintomáticas, que após análise demonstraram a presença do vírus de Língua Azul, contudo constatou-se que era uma nova estirpe pertencente a um serotipo previamente não caracterizado, o serotipo 27, e com semelhanças aos já descritos, os serotipos 25 e 26 (Zientara, *et al.*, 2014; Schulz, *et al.*, 2016).

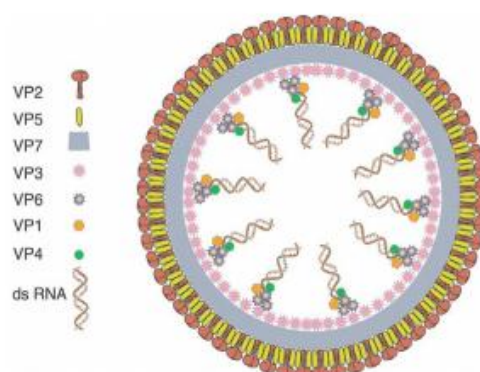


Figura 1. Esquema representativo dos segmentos de RNA e das proteínas estruturais que caracterizam o vírus de Língua Azul. Retirado de Schwartz-Cornil, *et al.* 2008 in Kyriakis, *et al.*, 2015.

2.2. EPIDEMIOLOGIA

2.2.1. DISTRIBUIÇÃO

A Língua Azul foi descrita pela primeira vez em 1876, na África do Sul e foi designada, também, por Febre Catarral Ovina por Hurtcheon, em 1881, contudo é provável que a doença se demonstre deste o início da criação de ovinos pelo Homem (Henning, 1956 in Maclachlan, 2011). Inicialmente pensava-se ser endémica nesta região, mas diversos surtos em outras zonas do planeta, como em Israel (1951), nos EUA (1952), na Península Ibérica (1956), no subcontinente indiano (1961), na Austrália (1975), em algumas ilhas gregas (1979) e mais recentemente em outras zonas da Europa, por exemplo, vieram provar o contrário (Kyriakis, *et al.*, 2015).

Assim, o vírus de Língua Azul está presente em zonas tropicais e temperadas em grande parte do mundo, tipicamente nas regiões com latitudes entre

35°S e 40°N a 50°N (Pascual-Linaza, *et al.*, 2014; Kyriakis, *et al.*, 2015). Neste momento, está presente em todos os continentes, exceto na Antártida (Maclachlan, 2011; Spedicato, 2016; European Commission, 2017). A sua distribuição (Figura 2) está condicionada pela presença de vetores competentes e dos seus habitats, ou seja, por fatores ecológicos (por exemplo, precipitação, temperatura, humidade e características do solo), sendo em muitas zonas do planeta de ocorrência sazonal (OIE, 2013). O período sazonalmente indemne é descrito pela Comissão Europeia (2017), como aquele, durante o qual e numa determinada zona geográfica epidemiologicamente relevante e durante uma parte do ano, não há sinais de transmissão do vírus ou, culicídeos adultos suscetíveis de serem vetores competentes.

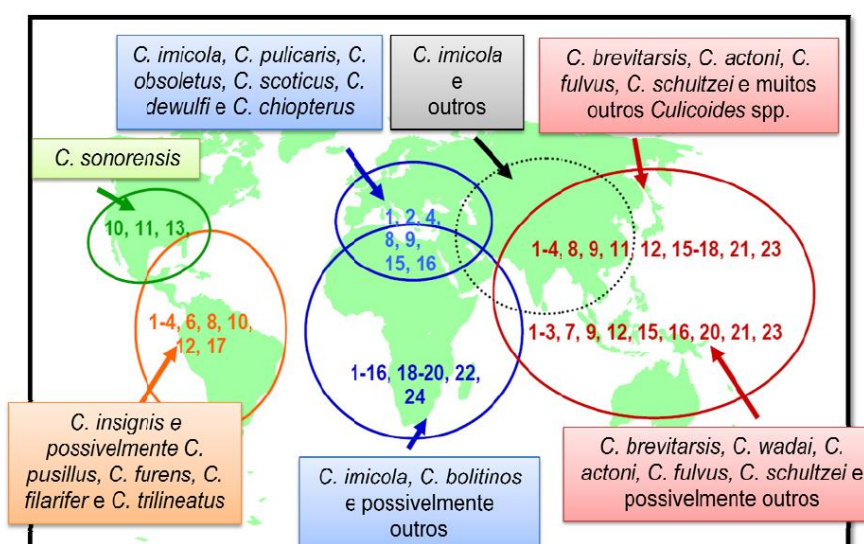


Figura 2. Distribuição mundial dos diversos serotipos de Lúngua Azul, assim como das principais espécies de culicídeos que transmitem o vírus de Lúngua Azul. Retirado de Rodrigues 2008, após ser adaptado de Maclachlan & Osburn, 2006.

Pensa-se que o vírus de Lúngua Azul tenha chegado à Europa por três vias (Figura 3): da Turquia/Chipre para a Grécia e Itália; do Norte de África (Algéria, Tunísia) para a Itália e ilhas mediterrânicas; e de Marrocos para o sul de Espanha e Portugal (Kyriakis, *et al.*, 2015).

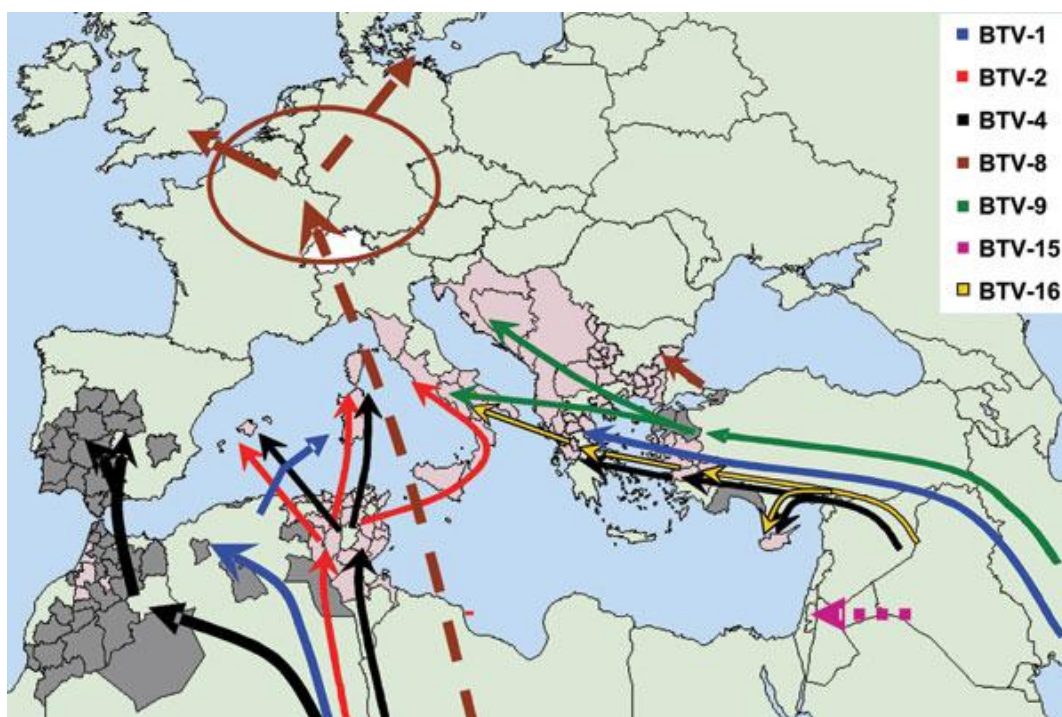


Figura 3. Possíveis rotas de entrada dos diversos serotipos do vírus de Língua Azul, na Europa desde 1998 até 2008 (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008).

Contudo, um dos surtos mais significativos já ocorridos, e acerca do qual ainda não foi possível concluir qual a via de entrada, foi entre 2006 e 2008 causado pelo serotipo 8, no norte e oeste da Europa, até à Escandinávia, bem como nas ilhas britânicas, tendo provocado graves perdas financeiras e desencadeado um enorme desenvolvimento ao nível da produção de vacinas inativadas eficientes contra o vírus e assim como, a aplicação dos programas de controlo da doença por parte das autoridades nacionais. Foram observados, ainda, outros surtos da doença na Europa, causados por vários serotipos, por exemplo, 1, 2, 4, 6, 9, 11, 16 e 25, tendo sido implementadas zonas de restrição temporária ou vacinação generalizada para incidentes menores ou maiores, respetivamente (Kyriakis, *et al.*, 2015).

Atualmente existem diversas áreas restritas, de acordo com o serotipo em circulação nesse local, como é observado na Figura 4.

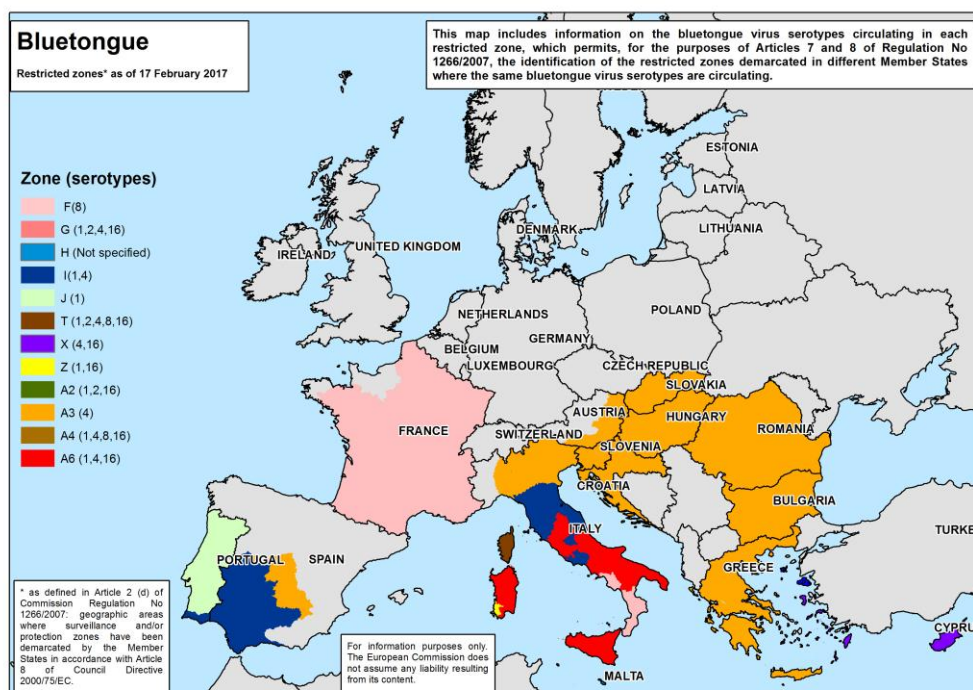


Figura 4. Zonas restritas, de acordo com o serotipo em circulação, em toda a Europa em Fevereiro de 2017. Portugal apresenta para todo o território continental a circulação do serotipo 1 e na região do Algarve, o 1 e o 4 (European Commission, 2017).

2.2.2. TRANSMISSÃO/VECTORES

O vírus de Língua Azul afeta um amplo espectro de ruminantes quer domésticos quer selvagens, no entanto, as espécies mais suscetíveis são sobretudo determinadas raças de ovinos, como por exemplo, raças melhoradas (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008) e algumas espécies de veados. Os bovinos e cabras, na maioria das vezes apresentam infeções subclínicas, podendo funcionar como importantes reservatórios da doença (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008).

A sua transmissão ocorre através de mosquitos hematófagos do género *Culicoides* (Figura 5). Existem cerca de 1500 espécies conhecidas, as quais são encontradas em todos os continentes, exceto Antártica, mas somente cerca de 50 apresentam capacidades de transmissão do vírus, sendo as mais significativas *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. variipennis*, *C. pulicaris*, *C. sonorensis*, *C. nubeculosus*, *C. dewulfi* e *C. chiopterus*. A espécie *C. imicola* é o vetor principal na África, no Oriente Médio, na maior parte do Sudeste Asiático e em algumas zonas do sul da Europa, incluindo Portugal (Kyriakis, *et al.*, 2015). A sua distribuição é restrita a determinadas regiões e o seu período de transmissão é limitado ao intervalo de tempo em que os vetores adultos estão ativos (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008; OIE, 2013).

Dependendo da espécie em causa, a atividade vetorial adulta geralmente começa na primavera e aumenta proporcionalmente com o aumento da temperatura até cerca de 28 a 30°C, por outro lado diminui com o decréscimo da temperatura (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008), sendo que o seu período de alimentação decorre sobretudo ao crepúsculo e noturno (Kyriakis, *et al.*, 2015), ou seja, acredita-se que a transmissão do vírus ocorra sobretudo nos meses mais quentes, onde se verifique um clima húmido, quente e calmo, existindo períodos sazonalmente livres de doença (European Commission, 2017).

Contudo, surgiram evidências recentes que sugerem a possibilidade da sobrevivência do vírus ao inverno, como por exemplo, na Califórnia, em fêmeas de *C. soronensis*, que foram infetadas durante o período anterior de atividade de voo (Mayo, *et al.*, 2014 *in* Kyriakis, *et al.*, 2015). Para além disto, existem algumas espécies de mosquitos que permanecem ativas ao longo de todo o ano, especialmente em áreas de inverno suave, como a bacia do Mediterrâneo, pelo que nestas zonas a transmissão do vírus pode ocorrer em qualquer momento (EFSA, 2017).

Para além destas evidências, têm surgido outras, ainda que limitadas, no que concerne a outras vias de transmissão da doença em relação a alguns serotipos, nomeadamente via transplacentária (existindo, mesmo algumas restrições ao movimento de fêmeas gestantes, para zonas restritas ao serotipo 8, na Europa (European Commission, 2017)), através de sémen infectado, via oral ou por contacto direto ou ainda, por transmissão iatrogénica (por exemplo, durante as vacinações), em diversos estudos como Menzies, *et al.*, 2008, Darpel, *et al.*, 2009, Mayo, *et al.*, 2010, Veronesi, *et al.*, 2010, Batten, *et al.*, 2014, Takamatsu, *et al.*, 2003 e *Al.*, 2008 (OIE, s/d; Sperlova & Zendulkova, 2011; Kyriakis, *et al.*, 2015). Contudo, o papel desempenhado por estas vias atípicas de transmissão na epidemiologia da doença, ainda não foi totalmente avaliada (Kyriakis, *et al.*, 2015).

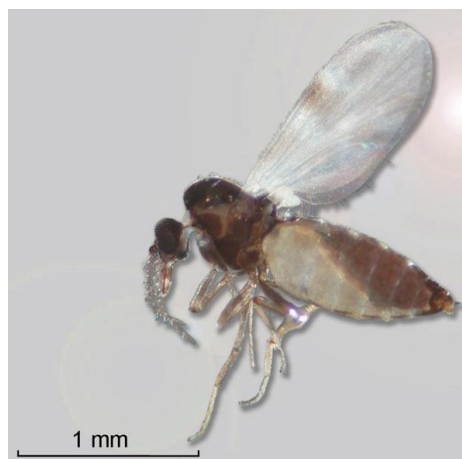


Figura 5. Exemplar de uma fêmea grávida, do género *Culicoides*, recolhida de um local próximo de alguns focos de Língua Azul, na Bélgica em 2006. Retirado de Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008.

2.3. PATOGENIA

Embora a infeção pelo vírus de Língua Azul seja frequentemente subclínica ou inaparente, a infeção também pode levar a doença grave com alta mortalidade em animais suscetíveis (Maclachlan, 2011; Kyriakis, *et al.*, 2015). Assim, a morbidade em ovinos pode atingir os 100%, e a mortalidade pode atingir os 50% a 70% em raças mais suscetíveis e dependendo do serotipo em causa. Já em animais selvagens, podem atingir os 90% (OIE, 2013).

A infeção com o vírus, ocorre após a picada dos mosquitos hematófagos infetados, sobretudo em zonas deslanadas, como a cabeça e o pescoço dos ruminantes, após a qual se verifica a sua replicação, disseminando-se por todo o organismo, afetando o endotélio vascular, penetrando nos macrófagos e nas células dendríticas de muitos tecidos e órgãos, como por exemplo, os pulmões e o baço. O período de incubação é de 5 a 20 dias nas ovelhas, surgindo a fase de virémia nos 3 a 4 dias posteriores à infeção (Maclachlan, *et al.*, 2009; DGAV, 2012).

2.3.1. SINAIS CLÍNICOS

Os principais sintomas descritos são: febre alta e depressão, hiperémia da mucosa bucal e nasal, aumento da salivação, lacrimejamento, secreção nasal, erosões e úlceras orais, claudicação (devido à hiperémia das bandas coronárias e a hemorragias ao redor dos cascos), fraqueza, edema: facial, da língua, dos lábios, das pálpebras e das orelhas, dificuldade no ato de deglutir e respirar e hálito fétido. A língua azul (Figura 6), provocada pelo edemaciamento exagerado, o qual provoca

a cianose, é também um dos sintomas, e aquele que lhe deu origem ao nome, contudo é raro. Em fêmeas gestantes pode ocorrer o aborto. Esta doença, por vezes, provoca ainda a morte, sobretudo devido a edema pulmonar, em alguns casos agudos, num período de 10 dias após a infeção (Maclachlan, 2011; Kyriakis, *et al.*, 2015).

Um outro sintoma, raro, mas por exemplo, relatado durante o surto de 2004 na Grécia, foi a presença de anemia, pelo que este sintoma pode ser utilizado como diagnóstico diferencial de outras patologias que provocam edema na cabeça (Kyriakis, *et al.*, 2015).



Figura 6. Exemplo de ovino com língua edemaciada, verificando-se a cianose da mesma, aspeto que originou o nome da doença, Língua Azul (Nogueira, *et al.*, 2007).

2.4. DIAGNÓSTICO

Os sinais clínicos da febre catarral ovina podem ser facilmente confundidos com os demonstrados por outras doenças que afetam os ruminantes, nomeadamente: febre aftosa, fotossensibilização aguda, estomatite micótica e estomatite vesicular, parainfluenza-3, varíola ovina, doença epizoótica hemorrágica dos veados, peira e poliartrite, peste dos pequenos ruminantes, fasciolose, pneumonia, salmonelose, peste bovina, rinotraquite infecciosa bovina, entre outras (Sperlova & Zendulkova, 2011; DGAV, 2012).

Por conseguinte, o seu diagnóstico clínico, em campo, com exceção da forma clássica e grave, pode ser muito difícil sem recorrer a meios auxiliares de diagnóstico, que incluem, o isolamento direto do vírus, a partir de amostras de sangue e tecidos, assim como a deteção de partículas virais e anticorpos em animais não vacinados (DGAV, 2012).

Contudo, uma célere e inequívoca confirmação da presença do vírus de Língua Azul, assim como do serotipo em questão, é fundamental no início de um surto, pois permite a seleção das medidas a tomar, assim como do tipo de vacina a aplicar, promovendo o controlo do mesmo. Historicamente, a confirmação laboratorial da presença do vírus de Língua Azul dependia do isolamento e amplificação do mesmo por exemplo, por inoculação de glóbulos vermelhos de ovelha ou tecido homogeneizado em ovos de galinha embrionados ou culturas de células. Sendo que para distinguir o serotipo em questão, era empregue o método de neutralização do vírus (Anonymous, 2002 *in* Breard, *et al.*, 2004).

Actualmente, para o diagnóstico diferencial laboratorial do vírus existem diversos testes que podem ser aplicados, nomeadamente testes serológicos (detetam presença de anticorpos): teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto e de competição (aplicados neste trabalho), AGID (*Agar Gel Immunodiffusion test*) e Seuroneutralização; e podem ser aplicadas técnicas de RT-PCR (*Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction*), as quais, permitem a distinção entre os diversos serotipos (Sperlova & Zendulkova, 2011; DGAV, 2012; Subhadra, *et al.*, 2014).

Dentro dos testes serológicos, o teste ELISA é amplamente utilizado, foi desenvolvido nos anos 70, contudo a sua difusão ocorreu sobretudo a partir de 1985 através do ensaio para anticorpos anti-HIV (Faulkner, 2010 *in* Moreira, *et al.*, 2011), este é um teste imunoenzimático baseado na interação antigénio-anticorpo (Crowther, 2001 *in* Moreira, *et al.*, 2011). É um método rápido, sensível e facilmente aplicável (Machado, *et al.*, 2001). Este método apresenta elevada sensibilidade (menor probabilidade de existirem falsos negativos), contudo baixa especificidade, ou seja, ao ser menos específico existe uma maior probabilidade de reação cruzada, isto é, um maior número de reações falso-positivas, ao detetar anticorpos contra outros arbovirus (OIE, 2014).

O método AGID, consiste numa reação de precipitação de antigénios por anticorpos, isto é, numa placa contendo sete poços com agar solidificado é colocado no poço central o antigénio e nos circundantes o soro de controlo positivo intercalado com o soro recolhido. Após incubação (48h), ocorre a difusão do antigénio do poço central e dos anticorpos se existirem dos poços externos. Esta difusão dos anticorpos quando presentes na amostra provoca uma linha de precipitação, a qual determina se o soro de teste é positivo ou não (OIE,

Bluetongue, 2013). Esta técnica é simples de utilizar e o antigénio utilizado no ensaio é de produção fácil e apresenta ainda um custo reduzido. Contudo, é um processo moroso e apresenta pouca sensibilidade, podendo levar a mais falsos negativos, principalmente em amostras com níveis reduzidos de anticorpos. Pelo que, apesar de ser considerado um teste padrão para fins de comércio internacional de ruminantes, desde 1982, a sua reduzida sensibilidade e subjectividade na leitura de resultados, têm vindo a incentivar o desenvolvimento e aplicação de outros testes mais específicos como o de ELISA (OIE, 2013; OIE, 2014).

A seroneutralização é um método de execução difícil e demorada (Rodrigues, 2008; OIE, 2014). Normalmente, a sua aplicação é mais útil quando associada a outros testes, sendo um teste adicional importante em áreas endémicas, onde podem existir múltiplos serotipos (OIE, 2014).

Por outro lado, o RT-PCR é um método molecular que permite a deteção e a identificação rápidas e fáceis dos diversos serotipos do vírus de Língua Azul, apresentando elevada sensibilidade. Este método possibilita a deteção de RNA viral até cerca de sete meses após o desaparecimento da virémia no animal. Através desta técnica, tal como decorre com a seroneutralização, é ainda possível distinguir se a infeção foi provocada por estirpes infecciosas de campo ou por estirpes vacinais (Breard, *et al.*, 2003 *in* Breard, *et al.*, 2004; Rodrigues, 2008; OIE, 2014).

Para concluir, na deteção e caracterização do vírus de Língua Azul, inicialmente são empregues testes específicos de serogrupo (ELISA) que detetam a presença do vírus, seguidos de testes específicos de tipo que identificam o genótipo e o serotipo em questão (RT-PCR; seroneutralização), fundamental para a seleção da vacina a administrar (OIE, 2014).

No entanto, os testes de diagnóstico da doença Língua Azul que são recomendados no Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, são o teste de ELISA para deteção de anticorpos contra o vírus e testes de neutralização para identificar e quantificar os diversos serotipos (Anonymous, 2002 *in* Breard, *et al.*, 2004; OIE, 2014).

2.5. TRATAMENTO E PROFILAXIA

2.5.1. TRATAMENTO

A Língua Azul, não apresenta tratamento, o único que se aplica é sintomático e visa a minimização do desconforto e o proporcionar de alívio aos

animais, sendo este composto por irrigações locais com desinfetantes suaves, e administração de terapias com líquidos e eletrólitos e antibióticos, para evitar possíveis infecções secundárias e movimentação do ovinos para zonas frescas e protegidas da luz solar (Sperlova & Zendulkova, 2011).

Assim, devem ser aplicadas medidas de profilaxia médica e sanitária, adaptadas à natureza de cada surto, nomeadamente à sua dispersão geográfica e à suscetibilidade da população animal nas regiões afetadas e nas adjacentes (Kyriakis, *et al.*, 2015).

2.5.2. PROFILAXIA MÉDICA

No que respeita à profilaxia médica, existe a administração de vacinas. Estas podem ser vacinas monovalentes ou polivalentes do vírus vivo atenuado, ou inativado. Não existe imunidade cruzada entre os vários serotipos da doença pelo que a vacinação é específica para cada um dos serotipos, assim o tipo de vacina a administrar deve estar de acordo com o verificado no campo. Por exemplo, as vacinas atenuadas, não podem ser aplicadas em áreas não endémicas durante a época de atividade do vetor, pois o vírus de Língua Azul pode ser transmitido durante o período de virémia inerente à administração da vacina, podendo ser transmitida a animais não vacinados e ainda pode ocorrer a recombinação de estirpes com as outras já existentes no campo, originando novas estirpes, podendo reverter a virulência do vírus e, por conseguinte, também a difusão da doença (DGAV, 2012; OIE, 2013), como ocorreu em 2008, nos Países Baixos e na Alemanha e na Bélgica, onde foram isoladas estirpes vacinais dos serotipos 6 e 11 do vírus da Língua Azul, respetivamente (De Clercq, *et al.*, 2009 *in* Kyriakis, *et al.*, 2015) introduzidas após o uso ilegal de vacinas atenuadas, consequência do desespero sentido pelos próprios produtores (Maclachlan, 2010 e Zientara e Sanchez-Vizcaino, 2013 *in* Kyriakis, *et al.*, 2015).

As vacinas atenuadas apresentam ainda outras desvantagens como, redução temporária da produção de leite, aborto ou morte embrionária em ovelhas gestantes, sobretudo entre a quarta e oitava semana de gestação e pode, ainda, ocorrer regressão e indução da doença em ovelhas vacinadas (DGAV, 2012; Kyriakis, *et al.*, 2015). Por outro lado, a utilização de vacinas monovalentes ou bivalentes inativadas demonstra ser segura e eficaz, como se observou no principal surto com o serotipo 8, que ocorreu na Europa em 2006-2008, contudo também

estas exibem inconvenientes, como o facto de serem mais caras e serem necessários mais momentos de imunização (Kyriakis, *et al.*, 2015).

Recentemente, tem-se verificado a produção de diversas vacinas, afim de colmatar as deficiências já apresentadas das vacinas comercializadas actualmente, nomeadamente uma vacina baseada no conceito: *Disabled Infectious Single Animal* (DISA), esta é uma vacina atenuada baseada no serotipo 6 e adaptada para o sorotipo 8, sem expressão das proteínas não estruturais NS3/NS3a. Após a vacinação, não foi detetado qualquer período de virémia, contudo aparenta ter um efeito de imunização mesmo após uma administração. É ainda de referir que, poderá ocorrer a diferenciação entre anticorpos de animais infectados e anticorpos de animais vacinados, pela ausência de expressão das proteínas não estruturais supracitadas, o que é relevante para monitorizar a propagação do vírus em animais vacinados (Feenstra, *et al.*, 2014).

2.5.3. PROFILAXIA SANITÁRIA

Por outro lado, no que concerne às medidas de profilaxia sanitária estas são implementadas de acordo com a designação de área livre de doença, através do controlo de movimentos de animais, quarentena, inquérito serológico e recolha de animais ao anoitecer e de madrugada e ainda controlo de vetores, ou no caso de áreas infetadas, aplicação de planos de controlo de vetores e palcos de vacinação para os serotipos em circulação (OIE, 2013).

Contudo o controlo da população de vetores, revela-se pouco eficaz devido ao seu extenso habitat de reprodução, estando dependente da destruição deste. De entre os diversos métodos utilizados constata-se o confinamento de animais ao crepúsculo e à noite, por exemplo em instalações protegidas com redes mosquiteiras ou a movimentação destes para áreas não consideradas de risco (zonas de altitudes elevadas, por exemplo) e o uso extensivo de larvicidas ou inseticidas químicos ou substâncias derivadas de plantas, nos animais e nas zonas envolventes às explorações e nos meios de transporte, os quais causam a morte rápida de insectos culicoides e também funcionam como repelentes (DGAV, 2012; Kyriakis, *et al.*, 2015). Podem ser utilizados fármacos com avermectinas, como ivermectina (Closamectim FF[®], por exemplo) ou doramectina (Dectomax[®], por exemplo) ou ainda contendo piretróides, como deltametrina (Butox 7,5 Pour On[®]) ou cipermetrina (Ectofly[®]) (DGAV, 2015; DGAV 2015a) e podem ainda ser utilizados

insecticidas para instalações (Responsar[®], ciflutrina, ou Saniterpen Inseticida DK[®], deltametrina, entre outros produtos comerciais) ou repelentes para animais (Oveneem[®], óleo de semente de neem) (DGAV, 2013).

E, para além destas medidas podem ser, ainda, realizados estudos entomológicos, por exemplo em áreas afetadas, através da colocação de armadilhas (Figura 7), em zonas específicas, e que possibilitem conhecer as espécies de culicídeos responsáveis pela transmissão da doença, assim como a sua distribuição, permitindo a obtenção de informação precisa, do local e no momento, condicionando o tipo de medidas quer de profilaxia médica, quer sanitária a adotar (DGAV, 2012).



Figura 7. Exemplo de armadilhas para captura de culicídeos e do local aconselhável de instalação na exploração. Retirado de Rodrigues, 2008.

2.6. CONTROLO E ERRADICAÇÃO DA DOENÇA

As medidas de controlo passam sobretudo pela redução do risco de exposição ao vetor e a redução do próprio número de vetores, contudo nenhuma destas medidas se revela particularmente eficaz.

De entre as medidas aplicadas em Portugal, e descritas nos diversos editais já publicados até ao momento, o último (Edital, n.º 43 da Língua Azul) publicado no início do corrente ano e suportados pela legislação da Comissão Europeia, destacam-se:

- o controlo da população de vetores: através da desinsectização dos animais, das instalações, das zonas circundantes e dos transportes; destruição dos habitats do vetor, como zonas de águas paradas, instalação de redes mosquiteiras e armadilhas (Cepeda, 2010; DGAV, 2014).

- quarentena e vigilância e avaliação epidemiológica: por exemplo, através da recolha de amostras de animais-sentinela (OIE, s/d).

- estabelecimento de restrições ao movimento de animais e de alguns produtos de origem animal, como por exemplo sémen, óvulos e embriões infectados (OIE, s/d).

- e, implementação de programas de vacinação. A vacinação é o procedimento de controlo base, não elimina a infeção, mas reduz significativamente o risco de perdas.

Segundo a EFSA – European Food Safety Authority – através da aplicação de programas de vacinação em massa, com duração de pelo menos cinco anos, em combinação com sistemas de vigilância contínuos e aperfeiçoados, seria possível erradicar a Língua Azul na Europa (EFSA, 2017).

3. A LÍNGUA AZUL EM PORTUGAL

Em 1956, ocorreu um surto de Língua Azul quer em Portugal, quer em Espanha, o qual provocou a morte a 46.000 ovelhas em Portugal e 133.000 em Espanha (OIE, s/d). Após esse período, de 1959 a 2004, verificou-se um silêncio epizoótico igualmente constatado em outros países da bacia do Mediterrâneo, como por exemplo a Grécia de 1989 a 1998; a Turquia, mais ou menos no mesmo intervalo de tempo, bem como a Argélia, França e Itália (DGAV, 2012).

Atualmente, em Portugal encontram-se em circulação o serotipo 1 da Língua Azul na totalidade do território continental e o serotipo 4 na região do Algarve (DGAV, 2017).

3.1.1. SEROTIPO 1

O primeiro foco foi registado em Setembro de 2007, na região do Alentejo, o que originou a delimitação de uma área geográfica sujeita a restrições, mais especificamente duas zonas de restrição a S4 (zona de circulação apenas do serotipo 4) e a S1-4 (zona de circulação simultânea de ambos os serotipos 1 e 4) e a implementação das medidas estabelecidas para estas situações, como por exemplo, restrições à movimentação animal em cada zona restrita e entre as duas e aplicação de planos de vigilância clínica, serológica e entomológica e de programas de vacinação (DGAV, 2017), como mencionado no Edital nº 16 de 21 de Setembro de 2007, revogado pelo Edital nº 17 de 23 de Outubro do mesmo ano.

Um ano depois (2008), verificou-se o mesmo serotipo, na zona Norte do país, o que culminou a que a totalidade do território nacional fosse considerado área geográfica sujeita a restrição. Tendo surgido novamente em 2012 (DGAV, 2017).

Depois seguiu-se um silêncio epizoótico, até 2015 (Edital nº 38 de 22 de Maio de 2015), momento em que re-emergiu em diversos concelhos na região do Alentejo e também na região do Algarve (Cordeiro de Sá, 2017; DGAV, 2017). Assim, e segundo o Edital nº 39 de 28 de Dezembro de 2015, foi desencadeada a aplicação do plano vacinal contra o serotipo 1 do efetivo ovino reprodutor adulto e dos jovens destinados a reprodução a partir dos 6 meses de idade, mediante a primo vacinação ou revacinação anual com vacina inativada, o qual se estipulou estar concluído até Maio de 2016 (fim do período livre de circulação do vetor), alargando-se a zona de intervenção dos concelhos de Castelo Branco, Idanha-a-Nova e Vila Velha de Rodão da DGAV da região Centro (Edital nº 38 de 22 de

Dezembro de 2015), a todos os concelhos da DGAV da região do Alentejo e a todos os concelhos da DGAV da região do Algarve (nestes últimos, manteve-se também a vacinação contra o serotipo 4).

Na sequência da deteção de mais um caso no concelho de Benavente, foi alargada novamente a zona obrigatória de vacinação aos concelhos de Benavente, Coruche, Alcochete, Palmela e duas freguesias do concelho do Montijo, Canha e Pegões, sendo ainda permitida a utilização de vacinas inativadas contra serotipos que não circulam em Portugal, mediante autorização prévia da DGAV e uma vez informada a Comissão Europeia segundo a Diretiva 2012/5/EU do Parlamento Europeu e do Conselho, de 14 de março de 2012, que altera a Diretiva 2000/75/CE do Conselho e de acordo com o Edital nº 41 de 25 de Outubro de 2016.

Visto continuar a constatar-se a progressão da doença, o Edital nº 42 de 18 de Novembro de 2016, estabelece o aumento da área de vacinação obrigatória aos concelhos de Abrantes, Chamusca, Setúbal, Sardoal, Proença-a-Nova e Fundão (Quadro 1).

3.1.2. SEROTIPO 4

Este serotipo foi observado pela primeira vez em Portugal, no fim do ano de 2004, e verificou-se a sua circulação até ao início de 2008, tendo sido aplicadas, tal como se constatou com o serotipo 1, uma série de medidas de controlo, que culminaram no decretar Portugal como zona livre de doença em 2010. Contudo, novamente em 2013, e na região de Algarve, no seguimento de algumas suspeitas clínicas, foi confirmada a presença do serotipo 4, tendo sido implementada a vacinação obrigatória contra esta estirpe, em ovinos, através da primo vacinação ou revacinação anual com vacina inativada, do efetivo ovino reprodutor adulto e dos jovens destinados à reprodução a partir dos 6 meses de idade, assim como também foi permitido o acesso à vacinação preventiva e de acordo com as especificações técnicas da vacina utilizada, na região do Alentejo de acordo com o risco de circulação viral nesta zona (DGAV, 2017), segundo o estabelecido no Edital nº 36 de 5 de Dezembro de 2014.

Para este serotipo não foram registados novos casos desde Novembro de 2013 (Edital nº 39 de 28 de Dezembro de 2015), mantém-se contudo a vacinação obrigatória para todos os concelhos da DGAV da região do Algarve, de acordo com o Edital nº 42 de 18 de Novembro de 2016.

No início deste ano entrou em vigor o Edital n.º 43 da DGAV sobre a Língua Azul, versão que vem revisar o Edital n.º 42, no qual consta que as medidas de combate à doença estão estabelecidas no Decreto-Lei n.º 146/2002, de 21 de maio e na Diretiva 2000/75/CE do Conselho, de 20 de Novembro, com as alterações que lhe foram introduzidas pela Diretiva 2012/5/EU do Parlamento Europeu e do Conselho, de 14 de março, cujas disposições de aplicação se encontram previstas no Regulamento (CE) n.º 1266/2007, da Comissão, de 26 de outubro, na sua versão atual, sendo elas sobretudo programas de vigilância, programas de vacinação e controlo da movimentação dos animais das espécies sensíveis e ações de controlo sobre o vetor.

Pelo que neste momento, é permitida a vacinação voluntária dos ovinos e bovinos existentes na totalidade do território continental, mediante autorização prévia, mantendo-se uma zona de vacinação obrigatória para ovinos, contra o serotipo 1, nos concelhos e freguesias indicados no edital em vigor e visíveis no Quadro 1 e, ainda se mantém a vacinação obrigatória contra o serotipo 4 em todos os concelhos da região do Algarve, prorrogando-se o já referido no Edital n.º 42 de 18 de Novembro de 2016. Prevê-se ainda, que este plano de vacinação obrigatório esteja concluído até 31 de Março de 2017.

Quadro 1. Concelhos e respetivas freguesias, onde é obrigatória a vacinação contra o serotipo 1 do vírus da língua azul, mediante a primeira vacinação ou revacinação anual com vacina inativada, do efetivo ovino reprodutor adulto e dos jovens destinados à reprodução a partir dos 6 meses de idade. Retirado de Edital n.º 43 da Língua Azul (2017).

Região	Concelhos	Freguesias
Centro	<i>Castelo Branco</i>	<i>Todas</i>
	<i>Fundão</i>	<i>Bogas de Cima, Castelejo, Castelo Novo, Janeiro de Cima/Bogas de Baixo, Orca, Póvoa de Atalaia/ Atalaia do Campo, Soalheira e Souto da Casa</i>
	<i>Idanha-a-Nova</i>	<i>Todas</i>
	<i>Oleiros</i>	<i>Todas</i>
	<i>Penamacor</i>	<i>Aranhas, Penamacor, Salvador, União de Freguesias de Aldeia do Bispo, Águas e Aldeia de João Pires e União de Freguesias de Pedrógão de S. Pedro e Bemposta</i>
	<i>Proença-a-Nova</i>	<i>Todas</i>
	<i>Sertã</i>	<i>Todas</i>
	<i>Vila de Rei</i> <i>Vila Velha de Ródão</i>	<i>Todas</i> <i>Todas</i>
Lisboa e Vale do Tejo	<i>Abrantes, Alcochete, Almeirim, Alpiarça, Benavente, Chamusca, Constância, Coruche, Entroncamento, Ferreira do Zêzere, Golegã, Mação, Moita, Montijo, Palmela, Salvaterra de Magos, Sardoal, Setúbal, Tomar, Vila Nova da Barquinha</i>	<i>Todas</i>
Alentejo	<i>Todos</i>	<i>Todas</i>
Algarve	<i>Todos</i>	<i>Todas</i>

E são ainda estabelecidas quatro zonas em todo o território nacional, de acordo com a circulação dos diversos serotipos: zona livre - Açores e Madeira; zona de restrição de serotipo 1: DGAV Norte, Centro e Lisboa e Vale do Tejo; zona de restrição de serotipo 1 e baixo risco de circulação de serotipo 4 - DGAV região do Alentejo e zona de restrição do serotipo 1 e 4: DGAV região do Algarve.

4. PARTE PRÁTICA

4.1. DEFINIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO – QUATRO CONCELHOS DA BEIRA INTERIOR

A ANCOSE - Associação Nacional de Criadores de Ovinos Serra da Estrela é uma entidade criada em Novembro de 1981, por um grupo de produtores de ovinos da raça autóctone Serra da Estrela, que apresenta como objetivos primordiais o melhoramento genético e a defesa da raça (ANCOSE, s/d).

Recorreu-se à associação, a fim de se obter a listagem de animais que iniciaram a campanha de contraste leiteiro no alavão 2015/2016, selecionando deste modo apenas animais contrastados, e por conseguinte apenas Ovelhas Serra da Estrela.

Inicialmente detínhamos um universo de cerca de 180 explorações distribuídas pelos concelhos de Arganil, Carregal do Sal, Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Gouveia, Mangualde, Nelas Oliveira do Hospital, Seia, Tábua e Viseu, região considerada o solar da raça.

Por questões práticas de organização do próprio trabalho de campo, quer ao nível das deslocações no terreno e mesmo da recetividade e colaboração dos próprios produtores e ainda, devido à sua representatividade no universo original e proximidade geográfica com o estabelecimento de ensino, definiu-se a área de estudo final, quatro concelhos da Beira Interior (Figura 8), num total de 105 explorações, 33 em Celorico da Beira, 17 em Fornos de Algodres, 35 em Seia e 20 em Gouveia.



Figura 8. Representação da área de estudo: os quatro concelhos selecionados da Beira Interior (Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Seia e Gouveia).

Após marcação prévia através de contacto telefónico, foram apenas autorizadas visitas a 56 explorações para recolha de leite de tanque, o que representa uma taxa de participação de 53.3%. Em particular participaram 14 explorações em Celorico da Beira, 6 em Fornos de Algodres, 23 em Seia e 13 em Gouveia, para recolha de amostras de leite. Em 27 explorações (25% do total de explorações) foi permitida a recolha de amostras de sangue: 8 explorações em Celorico da Beira, 5 em Fornos de Algodres, 5 em Gouveia e 9 em Seia. De cada uma destas explorações foram recolhidas 4 amostras de sangue.

Estas recolhas ocorreram inicialmente em Fevereiro de 2016 e foram repetidas em Junho de 2016, das mesmas explorações (amostras de leite) e dos mesmos animais (amostras sangue), respetivamente antes e após o período de circulação dos insetos vetores. Segundo a Comissão Europeia (2017), o período sazonal livre de vetores capazes de transmitir o vírus de Língua Azul, nesta época, foi entre 28 Dezembro de 2015 e 28 de Abril de 2016.

No total, foram recolhidas cerca de 105 amostras de leite e 204 amostras de sangue, como se observa no Quadro 2. Foi percorrido um total de cerca de 4000 km e realizados cerca de 1000 minutos de chamadas telefónicas, tendo-se visitado um total de 56 explorações na 1ª fase do trabalho e 49 explorações na 2ª fase, num total de 105 visitas a explorações.

Quadro 2. Discriminação do número de amostras recolhidas em Fevereiro e Junho de 2016. Está representado, quer o número total de explorações por concelho usadas para recolha de cada tipo de amostra (leite e sangue), quer o número de amostras de leite e o número de amostras de sangue, recolhido nos dois momentos, Fevereiro e Junho de 2016.

Concelho	Nº de explorações usadas para recolha de leite	Nº de explorações usadas para recolha de sangue	Fevereiro 2016		Junho 2016	
			Amostras Sangue	Amostras Leite	Amostras Sangue	Amostras Leite
Celorico da Beira	14	8	32	14	31	11
Fornos de Algodres	6	5	20	6	12	5
Gouveia	13	5	20	13	20	12
Seia	23	9	36	23	33	21
TOTAL	56	27	108	56	96	49

A seleção por amostras do tanque prende-se com o facto de ser uma recolha simples, rápida e que permite a avaliação de todo um efetivo, numa perspetiva de vigilância, já a opção pela recolha de amostras de sangue do animal, recaiu sobre a função como animais-sentinela, a fim de se tentar perceber a possível alteração do estatuto seroepidemiológico dos rebanhos/animais no que diz respeito à circulação do vírus.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia jugular, como observado na Figura 9, já as amostras de leite foram obtidas do tanque.

Ambas as amostras quer de sangue quer de leite foram recolhidas em tubos de 5ml de coleta de sangue estéreis, em plástico e sem anticoagulante (Figura 10). Cada amostra foi de imediato refrigerada (4°C) até ser centrifugada, a fim de se obter o soro (1500rpm/5min) e o lacto-soro (3500Gs/10min), respetivamente, através da centrifuga *Hettich* com rotor capaz de albergar tubos até 5 ml. Depois de obtidos,

quer por decantação (soro de sangue) quer por sucção (lacto-soro) foram congelados a cerca de -20°C até ser executado o teste de ELISA.

Todos os ovinos seleccionados apresentam 4 anos ou menos de idade, ou seja, foram excluídos animais que pudessem estar vacinados, uma vez que a última campanha de vacinação contra a Língua Azul, para a zona de estudo, ocorreu entre 2007 e 2011, evitando deste modo a alteração de resultados com deteção de anticorpos vacinais.



Figura 9. Colheita das amostra de sangue, por punção da veia jugular.

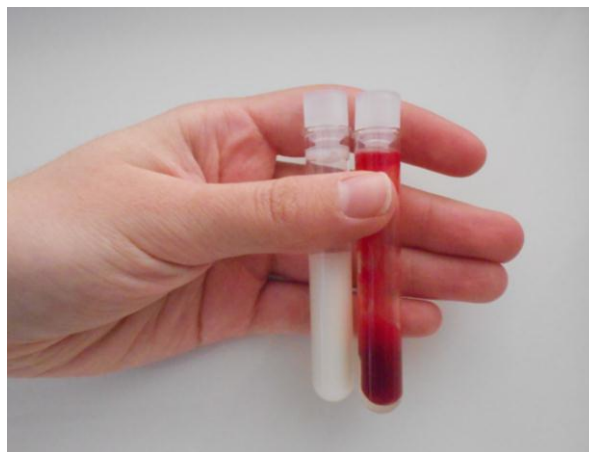


Figura 10. Exemplo dos tubos utilizados para recolha das amostras de sangue e de leite.

4.2.2. TRABALHO LABORATORIAL

Com as amostras já descongeladas e à temperatura ambiente (Figura 11) procedeu-se à aplicação do teste ELISA do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, sendo este um dos métodos mais utilizados para quantificar a concentração de anticorpos contra o vírus de Língua Azul.

Foram utilizados os *kits* comerciais ID Screen® Bluetongue Milk Indirect (Figura 12) e ID Screen® Bluetongue Competition (Figura 13) para a deteção de anticorpos contra a proteína VP7 (proteína estrutural principal do núcleo interno do vírus e a qual contém diversos antígenos (Chand, *et al.*, 2017)) do vírus de Língua Azul, respetivamente um teste ELISA indireto e um teste ELISA de competição. A técnica foi executada de acordo com as recomendações do fabricante.

Foram utilizadas microplacas de teste com 96 poços, revestidos por proteína VP7, os regantes (a $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) utilizados assim como as amostras foram previamente homogeneizados através de Vortex, antes de serem colocados nos diversos poços. Em todas as microplacas de teste foram estabelecidos dois poços de controlo negativo e dois de controlo positivo, utilizando $50\mu\text{l}$ de solução respetiva em cada. No fim de cada procedimento, as densidades óticas de todos os poços foram lidas a 450nm com recurso a espectrofotómetro.

No teste de ELISA indireto (Figura 12), em cada poço foram adicionados $50\mu\text{l}$ de solução de lavagem (previamente diluída em 20x em água destilada) e $50\mu\text{l}$ de amostra de lacto-soro em cada um, exceto nos de controlo. De seguida, procedeu-se à incubação ao longo de $45\text{min} \pm 4\text{min}$, a $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Após a qual, os poços foram lavados três vezes com cerca de $300\mu\text{l}$ de solução de lavagem, entre cada lavagem os poços foram secos e foi garantida a não presença de resíduos de

gordura nos mesmos. Foram adicionados 100µl de solução conjugado (anti-ruminante peroxidase (HRP), previamente diluído em 1/10 em solução tampão, a qual permite a fixação de resíduos livres de proteína VP7). Procedeu-se à incubação novamente durante 30min ± 3min, a 21°C ± 5°C, após a qual se instaurou novo processo de lavagem. De seguida foram adicionados 100µl de solução substrato (TMB, a qual vai provocar a reação de coloração), com nova incubação de 15min ± 2min, a 21°C ± 5°C, no escuro e por fim adicionados 100µl de solução stop (0.5 M), afim de, tal como o nome sugere, parar a reação. O resultado é positivo nos poços onde ocorre coloração (amarela), ou seja, na presença de anticorpos

Após serem lidas as densidades óticas (DO), foi validado o teste (valor da média das densidades óticas dos poços de controlo positivo (CP) é > 0,350; e a razão entre as DO dos poços de controlo positivo e dos de controlo negativo (CN) é > 3, e calculado o desvio padrão (S/P), em que:

$$S/P = (DO_{amostra} - DO_{CN}) / (DO_{CP} - DO_{CN}) \times 100$$

Sendo interpretado o resultado da seguinte forma: ≤ 30% é considerado um resultado negativo; entre 30% e 40% é considerado dúbio e ≥ 40% positivo.

No que respeita ao teste de ELISA de competição (Figura 13), foram adicionados 50µl de solução tampão, 50µl de amostra de lacto-soro, decorreu a incubação ao longo de 45min ± 4min, a 21°C ± 5°C, após a qual foram adicionados 100µl de conjugado (diluição a 1/10 em solução tampão). Depois de decorridos 30min ± 3min, a 21°C ± 5°C em incubação, as microplacas foram lavadas três vezes com solução de lavagem, tendo sido efetuada a secagem dos poços entre cada lavagem. Posteriormente, foram adicionados 100µl de solução substrato, e procedeu-se de novo à incubação durante 15min ± 2min, a 21°C ± 5°C no escuro. De seguida, foram adicionados 100µl de solução stop. Assim, a presença de anticorpos numa amostra de soro é observada devido à competição com um anticorpo específico dirigido ao antígeno presente, com a adição do substrato. A coloração (amarela) vai ser visualizada apenas nos poços sem anticorpos, ou seja, onde o resultado é negativo, os poços positivos, não apresentam coloração.

Após serem lidas as densidades óticas (DO), foi validado o teste (valor da média das densidades óticas dos poços de controlo negativo (CN) é > 0,700; e a razão entre as DO dos poços de controlo positivo e dos de controlo negativo (CN) é < 0,3), e calculado a percentagem de competição (S/N %), em que:

$$S/N\% = (DO_{amostra} / DO_{CN}) \times 100$$

Sendo interpretado o resultado da seguinte forma: $S/N\% < 40\%$ é considerado um resultado positivo e $S/N\% \geq 40\%$ negativo.

Todos os ensaios imunoenzimáticos foram realizados nas instalações do Laboratório de Virologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

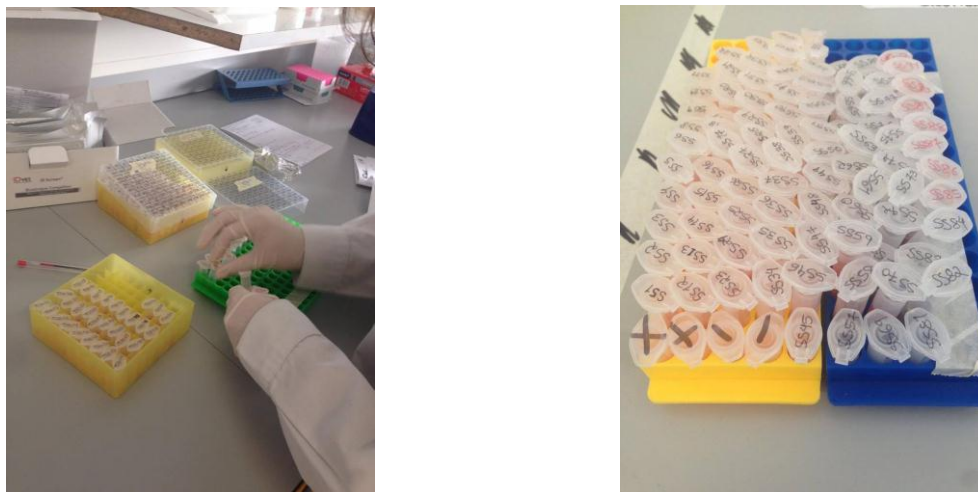


Figura 11. Organização/ disposição das amostras, numa placa exemplificativa da placa do teste de ELISA, numa fase prévia ao mesmo, a fim de facilitar a identificação das amostras com o resultado obtido.

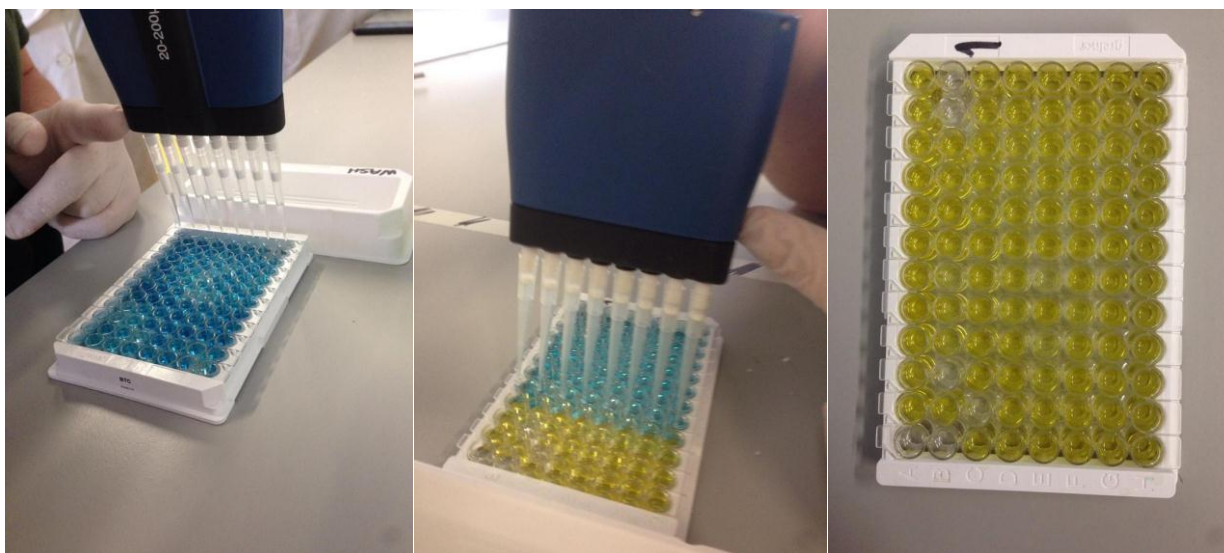


Figura 12. Representação de algumas das etapas na aplicação do teste ID Screen® Bluetongue Milk Indirect, nas amostras de lacto-soro.

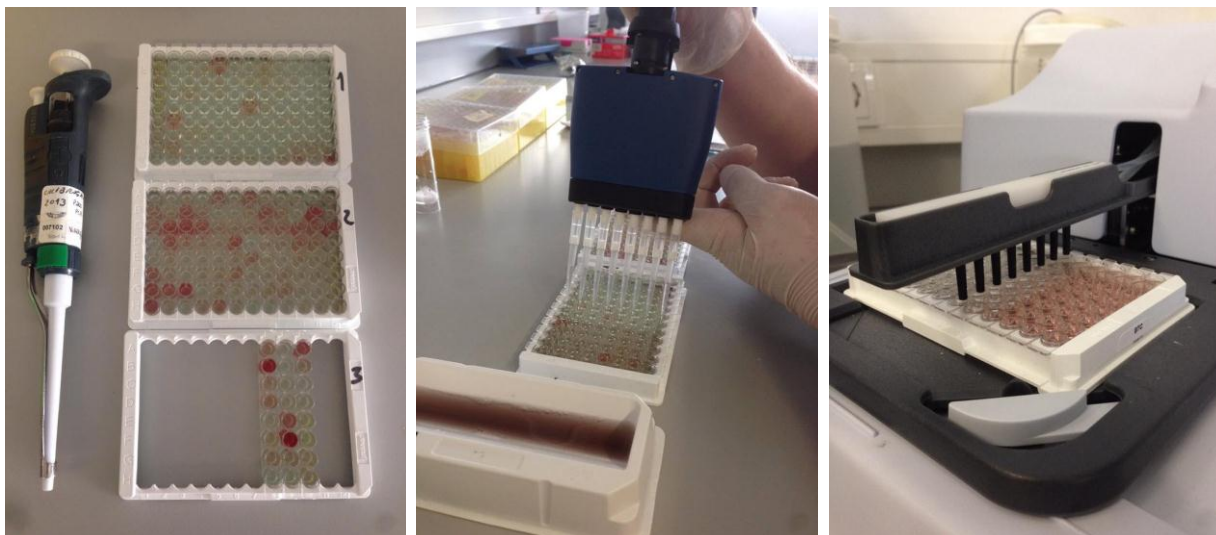


Figura 13. Representação de algumas das etapas na aplicação do teste ID Screen® Bluetongue Competition, nas amostras de soro de sangue.

4.2.3. MÉTODO ESTATÍSTICO UTILIZADO

Para tentar compreender melhor os resultados obtidos foi aplicado o teste de Qui-Quadrado, de modo a verificar se as diferenças observadas seriam ou não consideradas significativas. Este é um teste estatístico utilizado para medir a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre duas variáveis, neste caso a diferença entre os resultados obtidos no primeiro (Fevereiro 2016) e no segundo momento (Junho 2016) de recolha de amostras.

Para o estudo em questão, recorreu-se ao *software* Social Science Statistics tendo sido considerado para o estudo um nível de significância, $p > 0,05$ para comparação.

4.3. RESULTADOS

No momento um, Fevereiro de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 56 explorações visitadas (Quadro 3), 51 revelaram-se positivas o que dá uma prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul de 91,07%. No mesmo momento um, relativamente às amostras de sangue (Quadro 4), dos 108 animais testados (num total de 27 explorações), 5 mostraram-se positivos o que dá uma seroprevalência de 4,63% no grupo de animais

No momento dois, Junho de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 49 explorações visitadas (Quadro 3), 46 revelaram-se positivas, o que dá uma prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul de 93,88%. No mesmo momento dois, relativamente às amostras de sangue (Quadro 4), dos 96

animais testados (cerca de 26 explorações), 3 revelaram-se positivos, o que dá uma seroprevalência de 3,13% no grupo de animais.

Denota-se então que do momento um para o momento dois, ocorreu um aumento na prevalência relativamente às amostras de leite, já no que se refere à seroprevalência das amostras de sangue, ocorreu uma diminuição.

Contudo, do momento um para o momento dois, constataram-se algumas perdas de amostras de leite do tanque, nomeadamente de 7 explorações (devido à falta de disponibilidade por parte dos produtores; extinção de explorações; ou entrada no período de secagem, mais cedo do que o previsto). No que diz respeito às amostras de sangue perdeu-se 1 exploração, num total de 4 amostras de sangue e ainda ocorreram outras perdas de amostras, com animais que perderam o brinco, morreram ou desapareceram, num total de mais 8 amostras, afetando cerca de 6 explorações.

No entanto, quando aplicado o teste estatístico de Qui-Quadrado para a prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul nas amostras de leite do tanque e para a seroprevalência nas amostras de sangue, verifica-se que as diferenças observadas do momento um, Fevereiro de 2016, para o momento dois, Junho de 2016, não se revelaram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Quadro 3. Prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul nas amostras de soro de leite, nos dois momentos de recolha (o número total de explorações visitadas é igual ao número de amostras de leite recolhidas, pois em cada exploração foi recolhida apenas uma amostra de leite do tanque).

Nr. Total de explorações	Fevereiro 2016		Junho 2016	
	Amostras Positivas	Amostras Negativas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
	56		49	
Amostras leite	51	5	46	3
% amostras	91,07%	8,93%	93,88%	6,12%

Quadro 4. Seroprevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul nas amostras de soro de sangue, nos dois momentos de recolha. Está ainda discriminado o número de explorações e o número de animais afetado (em cada exploração visitada para colheita de amostras de sangue, foram recolhidas quatro amostras de sangue, isto é, foi recolhido sangue de quatro animais).

	Fevereiro 2016		Junho 2016	
Nr. Total de explorações	27		26	
	Amostras Positivas	Amostras Negativas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
Por exploração	3	24	2	24
% amostras	11,11%	88,89%	7,69%	92,31%
Nr. Total de Animais	108		96	
	Amostras Positivas	Amostras Negativas	Amostras Positivas	Amostras Negativas
Por nº de animais	5	103	3	93
% amostras	4,63%	95,37%	3,13%	96,87%

Por outro lado, é possível observar ainda detalhadamente os resultados por concelho, como se demonstra no Quadro 5 e nas Figuras 14 e 15.

Para o concelho de Celorico da Beira, no momento um, Fevereiro de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque (Figura 14), das 14 explorações visitadas, 10 explorações mostraram-se positivas para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, o que dá uma prevalência de 71,43%. No mesmo momento um, relativamente às amostras de sangue (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**), dos 32 animais testados, nenhum se revelou positivo, o que dá uma prevalência de 0%. No momento dois, Junho de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 11 explorações visitadas, 9 revelam-se positivas, o que dá uma prevalência de 81,82%. No mesmo momento dois, relativamente às amostras de sangue, dos 31 animais testados, nenhum se revelou positivo para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, o que dá uma seroprevalência de 0% no grupo de animais. Denota-se que do momento um para o momento dois, ocorreu um aumento na prevalência relativamente às amostras de leite (2 explorações negativas, no primeiro momento, revelaram-se positivas no segundo momento; 1 exploração positiva, no primeiro momento, verificou-se negativa no segundo momento; 1 amostra dúbia no primeiro momento), já no que se refere à seroprevalência das amostras de sangue, a mesma manteve-se nula. Contudo do momento um para o momento 2, constataram-se algumas perdas de amostras de leite, nomeadamente

de 3 explorações. No que se refere às amostras de sangue, perdeu-se 1 amostra (perda de brinco).

No concelho de Fornos de Algodres, no momento um, Fevereiro de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 6 explorações visitadas, todas se revelaram positivas para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, pelo que a prevalência é de 100%. No mesmo momento um, relativamente às amostras de sangue, dos 20 animais testados, nenhum se revelou positivo, o que dá uma seroprevalência de 0%. No momento dois, Junho de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 5 explorações visitadas, 5 revelam-se positivas, o que dá uma prevalência de 100%. No mesmo momento dois, relativamente às amostras de sangue, dos 12 animais testados, nenhum se revelou positivo, o que dá uma seroprevalência de 0% no grupo de animais. Denota-se que do momento um para o momento dois, não se registou qualquer alteração na prevalência/seroprevalência, quer relativamente às amostras de leite, quer às amostras de sangue. Contudo do momento um para o momento dois, constataram-se algumas perdas de amostras de leite, nomeadamente de 1 exploração (produtor não mostrou disponibilidade para a segunda recolha de amostras). No que se refere às amostras de sangue, perderam-se 8 amostras (devido a perdas de brinco, morte ou não disponibilidade do produtor).

No concelho de Gouveia, no momento um, Fevereiro de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 13 explorações visitadas, todas se revelaram positivas para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, pelo que a prevalência é de 100%. No mesmo momento um, relativamente às amostras de sangue, dos 20 animais testados, 1 animal revelou-se positivo, o que dá uma seroprevalência de 5%. No momento dois, Junho de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 12 explorações visitadas, todas se revelaram positivas, o que dá uma prevalência de 100%. No mesmo momento dois, relativamente às amostras de sangue, dos 20 animais testados, nenhum se revelou positivo, o que dá uma seroprevalência de 0% no grupo de animais. Denota-se que do momento um para o momento dois, não se registou qualquer alteração na prevalência relativamente às amostras de leite, no que se refere às amostras de sangue ocorreu uma diminuição da seroprevalência (1 animal demonstrou-se negativo no segundo momento). Contudo do momento um para o momento dois, constataram-se algumas perdas de

amostras de leite, nomeadamente de 1 exploração (período de secagem começou mais cedo do que o previsto).

Para finalizar, no concelho de Seia, no momento um, Fevereiro de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 23 explorações visitadas, 21 explorações revelaram-se positivas para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, pelo que a prevalência é de 91,30%. No mesmo momento um, relativamente às amostras de sangue, dos 36 animais testados, 4 revelaram-se positivos, o que dá uma seroprevalência de 11,11%. No momento dois, Junho de 2016, relativamente às amostras de leite do tanque, das 21 explorações visitadas, 20 revelam-se positivas, o que dá uma prevalência de 95,24%. No mesmo momento dois, relativamente às amostras de sangue, dos 33 animais testados, 3 revelaram-se positivos, o que dá uma seroprevalência de 9,09% no grupo de animais. Denota-se que do momento um para o momento dois, ocorreu um aumento na prevalência relativamente às amostras de leite (2 explorações negativas no momento um, revelaram-se positivas no momento dois; 1 exploração positiva, revelou ser negativa no momento dois), e uma diminuição na seroprevalência relativamente às amostras de sangue. Contudo do momento um para o momento dois, constataram-se algumas perdas de amostras de leite, nomeadamente de 2 explorações (extinção de exploração e início do período de secagem mais cedo do que o previsto). No que se refere às amostras de sangue, perderam-se 3 amostras (devido a perdas de brinco, morte, desaparecimento).

Quadro 5. Prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, nos dois momentos de recolha e para ambas as amostras biológicas, discriminado pelos quatro concelhos da área de estudo.

Concelho	Nº explorações para Amostras Leite	Nº explorações para Amostras Sangue	Fevereiro 2016		Junho 2016	
			Amostras sangue Positivas	Amostras leite Positivas	Amostras sangue Positivas	Amostras leite Positivas
Celorico da Beira	14	8	0	10	0	9
Fornos de Algodres	6	5	0	6	0	5
Gouveia	13	5	1	13	0	11
Seia	23	9	2	21	2	20
TOTAL	56	27	3	51	2	45

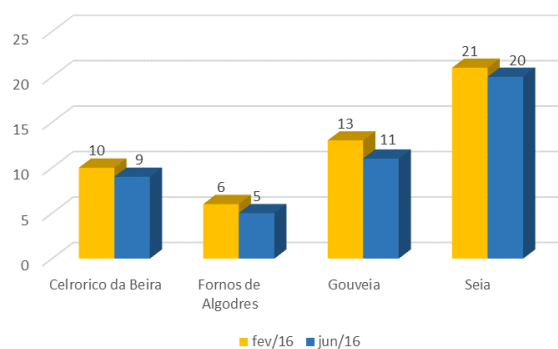
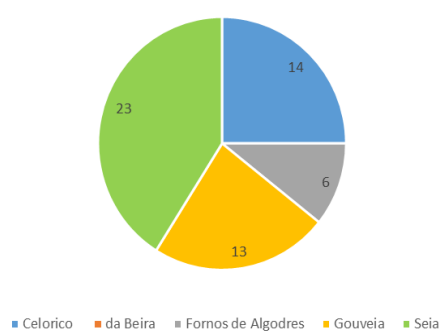


Figura 14. À esquerda, número de explorações visitadas para colheita de amostras de leite, por concelho. À direita, apresenta-se o número de amostras de leite positivas, nos dois momentos, Fevereiro e Junho de 2016, nos diversos concelhos que constituem a área de estudo.

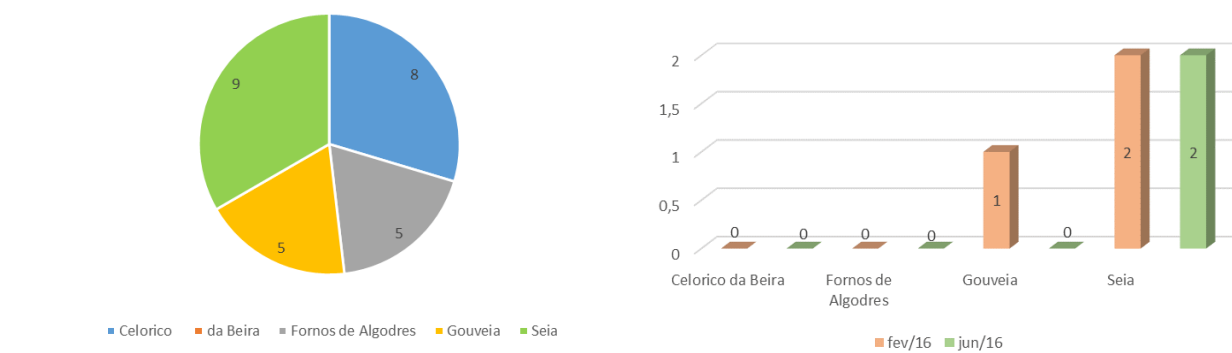


Figura 15. À esquerda, número de explorações visitadas para colheita de amostras de sangue, por concelho. À direita, apresenta-se o número de amostras de leite positivas, nos dois momentos, Fevereiro e Junho de 2016, nos diversos concelhos que constituem a área de estudo.

5. DISCUSSÃO

Ao analisarmos a prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul no momento um e no momento dois, relativamente às amostras de leite de tanque reparamos que aumentou de 91,07% para 93,88% o que pode sugerir que existe emergência do vírus de Língua Azul nesta região.

Contudo, estes resultados não implicam necessariamente a presença da doença, uma vez que são amostras do leite de tanque, onde está contemplado todo o efetivo, quer seja representado por animais vacinados (mais de quatro anos de idade) ou não vacinados, podendo o resultado obtido estar inerente à presença de anticorpos vacinais que os animais com mais de quatro anos de idade ainda apresentam desde o último plano de vacinação contra Língua Azul, em 2011.

Importa realçar, nos resultados obtidos no presente estudo, que apesar do aumento da prevalência, 3 explorações positivas para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul (no primeiro momento) se revelaram negativas no segundo momento, e que esta alteração pode estar relacionada com a saída de animais do efetivo, por diversas causas, por exemplo, morte, venda de animais, desaparecimento, ou antecipação do período de secagem. De realçar igualmente, que surgiram 4 explorações positivas no segundo momento, o que pode sugerir o aparecimento da Língua Azul nestas explorações, ou apenas, ser explicado por exemplo, pela aquisição de novos animais que podem estes também já ter sido vacinados.

No que concerne à prevalência da doença, através da amostragem de soro de sangue, e tal como nos estudos de Biteau-Coroller *et al.* (2006), sobre vigilância da doença, baseados na amostragem regular de sangue de espécies susceptíveis e na detecção de anticorpos por um kit comercial de ELISA de competição, realizados na ilha de Córsega e no sul de França continental, zonas consideradas de alto risco, verifica-se que a seroprevalência diminuiu de 4,63% para 3,13%, o que pode indicar que o vírus de Língua Azul está presente, mesmo que num número reduzido de animais, mas que a sua variação de Fevereiro para Junho de 2016 diminuiu na extensão geográfica da sua circulação, o que contraria o espectável, visto o segundo momento ter decorrido fora do período sazonalmente livre de vetores (entre 28 Dezembro de 2015 e 28 de Abril de 2016) decretado pela Comissão Europeia (2017), ou seja, no qual decorriam condições mais propícias à sua circulação. Seria

de prever um aumento do número de casos positivos, como decorreu no surto de 2004 a 2006, onde após um silêncio epizootico de 44 anos, surgiram novos casos de Língua Azul no outono de 2004, tendo sido detetados seis novos casos clínicos da doença em explorações de ovinos localizadas no sul de Portugal, perto da fronteira com Espanha. Os serotipos identificados apresentavam semelhanças com outros que circulam na bacia do mediterraneo desde 1998, sobretudo com os registados em 2003 na Sardenha e Córsega (serotipo 4) e em Itália (serotipo 2), demonstrando a normal circulação do vírus (Barros, *et al.*, 2007). No sul do país em que após um novo período de silêncio epizootico, o serotipo 1 re-emergiu em diversos concelhos na região do Alentejo e também na região do Algarve (Cordeiro de Sá, 2017; DGAV, 2017), sendo que desde Maio de 2015, tem-se verificado o aumento do número de casos, espelhado no conteúdo dos Editais nº 38 de 22 de Maio de 2015 ao nº 43 de 6 de Janeiro de 2017. E, na Andaluzia, em Julho de 2007, foi detetado pela primeira vez o serotipo 1 em explorações de ovinos, caprinos e bovinos, num total de 4436 explorações confirmadas, após uma monitorização da epidemia do vírus de Língua Azul, para o serotipo 1 (Allepuz, *et al.*, 2010). Entre outros casos em diversos países.

É ainda de salientar que os resultados verificados nos Ovinos Serra da Estrela se devem a um total de cerca de 5 animais positivos (3 explorações afetadas) para a presença de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, dos quais 1 animal morreu, 2 permaneceram seropositivos e 1 seronegativou, o que sendo animais que se vieram a revelar com idade superior à definida inicialmente (até 4 anos de idade) podem ser animais vacinados, e que portanto podem ainda apresentar anticorpos vacinais até ao momento. No entanto, para concluir com exatidão este cenário é necessário recorrer à implementação de outro tipo de técnicas de diagnóstico, como *Real Time* RT-PCR ou seroneutralização do vírus, por exemplo, através das quais é possível diferenciar os diversos serotipos e estirpes vacinais de estirpes naturais de campo (OIE, 2014), técnicas estas, aplicadas no estudo já referido que decorreu no seguimento do surto de 2004-2006, no sul de Portugal, onde foi analisada a epidemiologia molecular (ou seja, analisadas as sequências de nucleotídeos dos segmentos do genoma L2, S7 e S10, respectivamente, para proteínas estruturais virais (VP2 e VP7) e não estruturais (NS3)), das estirpes do vírus de Língua Azul, que circularam neste período para determinar o serotipo e explorar a origem do mesmo com recurso a diversas

técnicas de entre as quais *Real Time* RT-PCR, tendo sido discriminados cinco casos do serotipo 4 e um do sorotipo 2, isolados de ovinos e bovinos (Barros, *et al.*, 2007).

Ainda, quanto ao animal que seronegativou, este pode ser explicado pelo mesmo facto, mas devido ao tempo decorrido desde o plano de vacinação implementado, pode ter deixado de apresentar a imunidade concedida pelos anticorpos vacinais, não sendo estes revelados em Junho de 2016. Sendo neste caso, também importante implementar outras técnicas para tentar elucidar sobre o alcance da própria vacina. No sentido de serem ultrapassadas estas dificuldades que interferem com o diagnóstico, estão a ser desenvolvidas vacinas atenuadas, nas quais não são expressas, algumas proteínas estruturais, como NS3/NS3a, cuja ausência permite efetuar a distinção entre estirpes vacinais e não vacinais e ainda a monitorização da propagação do vírus em animais vacinados (Feenstra, *et al.*, 2014).

Para melhor serem compreendidos os resultados obtidos neste estudo de monitorização de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul em Ovelhas Serra da Estrela foi aplicado o teste estatístico de Qui-Quadrado, podendo-se referir que as diferenças mencionadas supra entre o primeiro e o segundo momento de recolha, quer ao nível da prevalência, quer ao nível da seroprevalência, não se revelaram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

De forma genérica, os resultados alcançados não estão longe dos esperados atendendo a que normalmente a distribuição do vírus está relacionada com a presença de vetores adultos ativos numa determinada área, sendo a selecionada para este estudo, caracterizada por altitudes mais elevadas e temperaturas com grande amplitude de variação, ou seja, não apresenta as condições mais propícias ao desenvolvimento da atividade do vetor, como locais caracterizados por um clima húmido, quente e calmo (Saegerman, Berkvens, & Mellor, 2008; Kyriakis, *et al.*, 2015; European Commission, 2017). No entanto, o vírus de Língua Azul tem-se disseminado para outras zonas que se pensavam ser não propícias ao desenvolvimento do vetor, como por exemplo com o surto que decorreu entre 2006 e 2008, causado pelo serotipo 8, no norte e oeste da Europa, até à Escandinávia, bem como nas ilhas britânicas acerca do qual ainda não foi possível concluir sobre a via de entrada (Kyriakis, *et al.*, 2015), mas, desde 1998 que se têm verificado alterações regionais drásticas na distribuição global do vírus de Língua Azul, sobretudo na Europa (Maclachlan, 2011). Assim, apesar do que

inicialmente se acreditava, que fosse apenas endêmico no norte da África, Oriente Médio e Turquia (Walton, 2004; Mellor *et al.*, 2008), está presente em todos os continentes, exceto Antártida (Maclachlan, 2011; Spedicato, 2016; European Commission, 2017), o que demonstra a sua capacidade de emergência e re-emergência, e por conseguinte a importância da aplicação de estudos de monitorização, que permitam conclusões rápidas sobre as medidas a aplicar, permitindo o controlo do surto e minimizando o impacto económico que esta doença acarreta.

6. CONCLUSÃO

O vírus de Língua Azul encontra-se distribuído um pouco por todos os continentes, exceto Antártida. Nos últimos anos, têm-se observado alterações regionais drásticas ao nível da sua distribuição global, principalmente na Europa. Para explicar este facto, diversos autores apontam as alterações climáticas e consequente adaptação dos vetores a outras zonas consideradas, não endémicas. A movimentação de animais e o movimento dos ventos, contribuem igualmente para o aumento da distribuição mundial deste vírus. Esta rápida e incerta disseminação dos diversos serotipos e por conseguinte, o aparecimento de diversos surtos da doença acarreta consequências socioeconómicas graves, com repercussão severa no comércio internacional de animais e produtos de origem animal, como ocorreu, por exemplo, com o surto de 2006-2008, com o serotipo 8, no norte e oeste da Europa.

A implementação de planos de monitorização/vigilância é essencial para evitar/controlar a disseminação da doença. As campanhas de imunização quando aplicadas no momento propício são um bom exemplo de medidas de profilaxia sanitária bem-sucedidas na limitação e controlo da mesma. Apesar de por si só estas medidas não erradicarem a doença, a forma e o momento em que são aplicadas pode determinar o grau de perdas que se venha a verificar. Por conseguinte, veterinários e produtores devem manter-se em vigilância constante a fim de informarem imediatamente sobre possíveis surtos e as autoridades responsáveis nacionais devem ter planos de contingência prontos a implementar.

Em relação à região do país estudada neste trabalho, a prevalência registada para anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul nas amostras de leite, não permite concluir sobre a emergência da doença nos quatro concelhos da área de estudo, uma vez que foi avaliado todo o efetivo, incluindo ovelhas com mais de quatro anos de idade, podendo ainda apresentar anticorpos vacinais apesar do plano de vacinação ter terminado em 2011.

No que concerne à seroprevalência da doença, através da amostragem de soro de sangue, conclui-se que apenas em três explorações foram detetados anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul, num total de cerca de 5 animais infetados, contudo ao constatarem-se ser animais com mais de quatro anos e portanto podendo estar vacinados, também não indica a presença de doença nos concelhos seleccionados.

Assim, a emergência/re-emergência do vírus de língua Azul em Ovinos da Serra da Estrela em Celorico da Beira, Fornos de Algodres, Seia e Gouveia não está claramente definida. Sendo a área de estudo, uma zona com condições climáticas não propícias à circulação do vetor, pode explicar estes resultados, mas por outro lado, esta zona pode desempenhar um papel de local modelo para monitorização do vírus e para monitorização da adaptação do vetor a zonas, que se pensam ser não favoráveis. Pode-se ainda referir, que sendo anticorpos vacinais os detetados neste estudo, e através de outro tipo de análises que se possam realizar, é possível concluir acerca da cobertura vacinal concedida pelas vacinas desde o período de vacinação em 2011.

As limitações surgidas no decorrer deste trabalho, incitam a que mais pesquisas precisem de ser desenvolvidas nesta região e nesta raça para concluir sobre a prevalência de anticorpos IgG contra o vírus de Língua Azul em Ovinos Serra da Estrela, sendo este apenas um trabalho preliminar, pretendendo ser o início de outros estudos mais aprofundados na mesma área.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allepuz, A., García-Bocanegra, I., Napp, S., Casal, J., Arenas, A., Saez, M., & González, M. (2010).** Monitoring bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007. *Preventive Veterinary Medicine, Volume 96(3-4)*: 263-271. Obtido de <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.06.005>
- Barros, S., Ramos, F., Luís, T., Vaz, A., Duarte, M., Henriques, M., . . . Fevereiro, M. (2007).** Molecular epidemiology of bluetongue virus in Portugal during 2004–2006 outbreak. *Veterinary Microbiology, 124(1-2)*: 25-34. Obtido de <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.014>
- Biteau-Coroller, F., Gerbier, G., Stärk, K., Grillet, C., Albina, E., Zientara, S., & Roger, F. (2006).** Performance evaluation of a competitive ELISA test used for Bluetongue antibody detection in France, a recently infected area. *Veterinary Microbiology, 118(1–2)*: 57-66. Obtido de <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.012>
- Bonneau, K., & MacLachlan, N. (2004).** Genetic diversification of field strains of bluetongue virus. *Veterinaria Italiana, 40(4)*, 446-447. Obtido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20422567>
- Breard, E., Hamblin, C., Hammoumi, S., Sailleau, C., Dauphin, G., & Zientara, S. (2004).** The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica, *77(1)*: 1-8. Obtido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528803001486#aep-section-id13>
- Cepeda, R. (2010).** *Avaliação de eficácia de produtos biocidas no processo de autorização para comercialização, e sua aplicação no controlo de Culicoides em surtos de Língua Azul. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.* Obtido de <http://hdl.handle.net/10400.5/2589>
- Chand, K., Biswas, S., Pandey, A., Saxena, A., Tewari, N., & Mondal, B. (2017).** A competitive ELISA for detection of group specific antibody to bluetongue virus using anti-core antibody. *Biologicals, 46*: 168-171. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.01.002>

- Cordeiro de Sá, A. (2017).** Luta contra Língua Azul dos ovinos tem novas regras. *Agricultura e Mar Actual*, pp. <http://agriculturaemar.com/luta-lingua-azul-dos-ovinos-novas-regras/>.
- DGAV. (2016).** Edital nº 41 da Língua Azul/ Febre Catarral Ovina de 25 de Outubro de 2016.
- DGAV. (2016).** Edital n.º 42 da Língua Azul/ Febre Catarral Ovina de 18 de Novembro de 2016.
- DGAV. (2012).** Manual de operações - Língua Azul.
- DGAV. (2013).** Lista de Inseticidas Autorizados para instalações contendo substâncias com eficácia conhecida contra mosquitos do género *Culicoides* spa.
- DGAV. (2014).** Febre Catarral Ovina/ Língua Azul - Folheto Informativo de Abril de 2014.
- DGAV. (2015).** Lista de Medicamentos contendo Piretróides para Espécies Pecuárias.
- DGAV. (2015a).** Lista de Medicamentos com Avermectinas - Bovinos, Ovinos e Caprinos.
- DGAV. (2017).** *Língua azul (febre catarral ovina)*. Obtido de <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18284&generico=18285&cboui=18285>
- DGAV. (2015).** Edital nº 38 da Língua Azul/Febre Catarral Ovina de 22 de Maio de 2015.
- DGAV. (2015).** Edital nº 39 da Língua Azul/ Febre Catarral Ovina de 28 de Dezembro de 2015 .
- DGAV. (2016).** Edital nº 36 da Língua Azul /Febre Catarral Ovina de 5 de Dezembro de 2016.
- DGAV. (2017).** Edital n.º 43 da Língua Azul /Febre Catarral Ovina de 6 de Janeiro de 2017.
- DGV. (2007).** Edital nº 16 da Língua Azul/ Febre Catarral Ovina de 21 de Setembro de 2007.
- DGV. (2007).** Edital nº 17 da Língua Azul/ Febre Catarral Ovina de 23 de Outubro de 2007.
- EFSA. (2017).** *Bluetongue: EFSA reviews control measures*. Obtido de European Food Safety Authority: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170308>

- European Commission. (2017).** *Bluetongue.* Obtido de http://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/bluetongue_en
- Feenstra, F., van Gennip, R., Maris-Veldhuis, M., Verheij, E., & van Rijn, P. (2014).** Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent BTV challenge. *Journal of General Virology*, 95: 2019-2029. Obtido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914064>
- Hoffmann, B., Saßerath, M., Thalheim, S., Bunzenthall, C., Strebelow, G., & Beer, M. (2008).** Bluetongue Virus Serotype 8 Reemergence in Germany, 2007 and 2008. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9). Obtido de https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/9/08-0417_article
- Kyriakis, C., Billinis, C., Papadopoulos, E., Vasileiou, N., Athanasiou, L., & Fthenakis, G. (2015).** Bluetongue in small ruminants: An opinionated review, with a brief appraisal of the 2014 outbreak of the disease in Greece and the south-east Europe. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2): 66-74. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.004>
- Maan, N., Maan, S., Belaganahalli, M., Pullingera, G., Montes, A., Gasparini, M., . . . Mertens, P. (2015).** A quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) assay to detect genome segment 9 of all 26 bluetongue virus serotypes. *Journal of Virological Methods*, 213: 118-126. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.11.012>
- Maan, S., Maan, N., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M., . . . Mertens, P. (2011).** Novel Bluetongue Virus Serotype from Kuwait. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5). Obtido de https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-1742_article
- Machado, H., Piffer, I., Guidoni, A., Klein, C., & Gil-Turnes, C. (2001).** Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53: 513-522. Obtido de <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v53n5/a01v53n5.pdf>
- Maclachlan, N. (2011).** Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2): 107-111. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.005>

- Maclachlan, N., Drew, C., Darpel, K., & Worwa, G. (2009).** The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*, 141(1): 1-16. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.04.003>
- Moreira, R., Capela, I., Almeida, D., Mesquita, J., Nóbrega, C., & Vala, H. (2011).** Método ELISA e suas aplicações em diagnóstico. *Proceedings of 2nd International Congress of Veterinary Nursing*: 14-16. Obtido de Proceedings of 2nd International Congress of Veterinary Nursing: <http://repositorio.ipv.pt/handle/10400.19/1422>
- Nogueira, A., Cardoso, T., Ferrari, C., Pituco, E., Stefano, E., & Curci, V. (2007).** *Língua Azul em Ovinos*. Obtido de http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/LinguaAzul/index.htm
- OIE. (2013).** *Bluetongue*. Obtido de World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BLUETONGUE.pdf
- OIE. (2014).** Bluetongue (Infection with Bluetongue Virus). *OIE Terrestrial Manual, Capítulo 2.1.3*. Obtido de http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUE_TONGUE.pdf
- OIE. (s/d).** *Bluetongue - General Disease Information Sheets*. Obtido de <http://www.oie.int/doc/ged/D13959.PDF>
- Pascual-Linaza, A., Martínez-López, B., Pfeiffer, D., Moreno, J., Sanz, C., & Sánchez-Vizcaíno, J. (2014).** Evaluation of the spatial and temporal distribution of and risk factors for Bluetongue serotype 1 epidemics in sheep Extremadura (Spain), 2007–2011. *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 116(3): 279-295. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.05.009>
- Rodrigues, L. (2008).** *Epidemiologia e estudo entomológico dos potenciais vetores do vírus da língua azul na região do vale do tejo - Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa*.
- Saegerman, C., Berkvens, D., & Mellor, P. (2008).** Bluetongue Epidemiology in the European Union. *Emerging Infectious Disease*, 14(4). Obtido de https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/4/07-1441_article#tnF1
- Schulz, C., Bréard, E., Sailleau, C., Jenckel, M., Vilarouge, C., Vitour, D., . . . Zientara, S. (2016).** Bluetongue virus serotype 27: detection and

- characterization of two novel variants in Corsica, France. *Journal of General Virology*, 97(9): 2017-2083. Obtido de <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000557>
- Spedicato, M. (2016).** Diseases of Dairy Animals: Infectious Diseases: Bluetongue. *Reference Module in Food Science*, -. Obtido de <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00721-6>
- Sperlova, A., & Zendulkova, D. (2011).** Bluetongue: a review. *Veterinarni Medicina*, Volume 56(9): 430-452. Obtido de <http://vri.cz/docs/vetmed/56-9-430.pdf>
- Subhadra, S., Kumar, S., Suryanarayana, V., & Sreenivasulu, D. (2014).** Comparison of bluetongue virus detection and quantitation methods in south India. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(10): 1307-1312. Obtido de <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/viewFile/25313608/1172>
- Zientara, S., Saill, C., Viarouge, C., Höper, D., Beer, M., Jenckel, M., . . . Fablet, A. (2014).** Novel Bluetongue Virus in Goats, Corsica, France, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12). Obtido de https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/12/14-0924_article