

I Perspetiva Laboratorial do Diagnóstico de Língua Azul em Portugal

O vírus da língua azul (BTV do inglês Bluetongue Virus), tal como outros vírus transmitidos por artrópodes, é um agente patogénico emergente, cuja distribuição global tem aumentado em consequência das alterações climáticas, urbanização e intensificação das viagens internacionais. A emergência de novos serotipos de BTV, em países ou regiões historicamente enzoóticas, revela divergência nas vias de disseminação da doença associada a cada um dos serotipos virais, facto que exige a implementação de medidas de vigilância dos efetivos, e dos animais importados introduzidos nas mesmas. O diagnóstico laboratorial, ao permitir a identificação, caracterização e a estimativa da prevalência dos diferentes serotipos, em áreas geograficamente distintas, assume um papel-chave na rede de epidemiovigilância da doença.

Silvia. C. Barros

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)
NOVA School of Science and Technology

Tiago Luís

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Fernanda Ramos

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Ana Margarida Henriques

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Isabel Almeida

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Teresa Fagulha

Instituto Nacional de Investigação Agrária

e Veterinária (INIAV, I.P.)

Carina Carvalho,

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Fábio Abade dos Santos

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária

e Margarida D. Duarte

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária

Introdução

A febre catarral ovina, também conhecida por Língua Azul (LA), é uma doença de etiologia viral que afeta ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos) e selvagens (veados, camelos, antílopes e búfalos). A transmissão da doença ocorre através de insetos hematófagos, pertencentes ao género *Culicoides*, que asseguram a transmissão do vírus ao picarem um animal saudável, após terem contraído a infeção por contato com um animal infetado em fase de virémia (vírus presente no sangue)¹. Não ocorre transmissão direta do vírus entre animais. Nas áreas afetadas, a LA tem uma distribuição sazonal, com maior incidência no verão, quando o aumento da temperatura favorece a reprodução e manutenção dos vetores *Culicoides* no meio ambiente, potenciando a transmissão do vírus¹.

A gravidade da doença varia de acordo com a estirpe viral infetante e a espécie de hospedeiro, exibindo uma forma exuberante nos ovinos, que contrasta com o quadro assintomático ou ligeiro nos bovinos. Nos ovinos o quadro sintomatológico é marcado pelo aparecimento de edemas e lesões ulcerativas na língua e cavidade oral, que podem ser acompanhadas por cianose (coloração azulada) dos lábios e língua, sinal que dá o nome à doença (Fig. 1). Uma vez que os sinais clínicos não são específicos da LA, é necessário proceder-se ao diagnóstico diferencial, nomeadamente para o poxvirus responsável pelo ectima contagioso, diagnosticado em Portugal com alguma frequência.

Uma vez que a doença é muito mais exuberante nos ovinos, os países afetados preconizam apenas a vacinação desta espécie animal. Os caprinos e bovinos não são habitualmente vacinados, funcionando como animais sentinela, nos quais a deteção de vírus ou de anticorpos não só é indicativo da circulação BTV na região,

como um sinal de alerta para a autoridade sanitária competente para o risco de novas infeções.

Em matéria de movimentação e comércio de animais, a LA está sujeita a uma regulamentação restricta, estando incluída na lista de doenças de declaração obrigatória da OIE¹.

Os prejuízos decorrentes da LA são múltiplos e significativos. Os principais são de caráter económico e resultam da elevada morbidade e mortalidade, incluindo os abortos, alterações do índice de sobrevivência das ninhadas, ou de prolificidade das fêmeas gestantes¹. Outros decorrem da imposição de restrições ao comércio internacional de animais e produtos de origem animal, dos custos associados aos programas de vacinação e vigilância, controlo de vetores e do tratamento de animais infetados. É de salientar que a exportação destes animais exige a emissão de um certificado de sanidade atestando a ausência de LA.

Estão reconhecidos, até à data, 29 serotipos distintos do vírus da Língua Azul (BTV)^{2,3}. A grande variabilidade genética que este vírus apresenta resulta, em parte, da natureza segmentada do seu genoma, que é composto por 10 segmentos de RNA de dupla cadeia. Isto possibilita a ocorrência de troca de segmentos genéticos entre vírus quando uma célula é simultaneamente infetada por mais do que um serotipo de BTV⁴. Estes eventos de recombinação podem gerar novas variantes virais com genótipos e propriedades biológicas distintas, como por exemplo maior virulência, capacidade de infetar outros hospedeiros, capacidade de transmissão por outros vetores, ou capacidade de evasão à resposta imunitária do hospedeiro⁴. As características pouco comuns do vírus do serotipo BTV-8, altamente virulento, ilustram claramente os princípios subjacentes à emergência de novos vírus.

Desde 2004, têm sido reportados em Portugal vários surtos de LA, associados a dois serotipos de vírus, nomeadamente o serotipo 1 (BTV-1) e o serotipo 4 (BTV-4)^{4,5}, que não induzem imunidade cruzada entre si, uma vez que os anticorpos desenvolvidos contra um destes serotipos não protegem contra a infeção pelo outro. Isto implica a escolha das vacinas a aplicar ao efetivo nacional em função do serotipo circulante.

O INIAV é o Laboratório Nacional de Referência para as doenças dos animais em Portugal e é responsável pelo diagnóstico de LA a nível nacional. Possui, por isso, um banco único de estirpes virais, isoladas ao longo dos anos. A determinação da variabilidade genética dos vírus de campo através da sequenciação nucleotídica das estirpes emergentes, é crucial para a identificação da origem dos surtos e do



Figura 1: Ovinos com sinais clínicos de Língua Azul (Fontes: National Farmer Union (NFU); <http://bluetonguesheep.blogspot.com/2012/01/symptoms-and-diagnosis.html>).

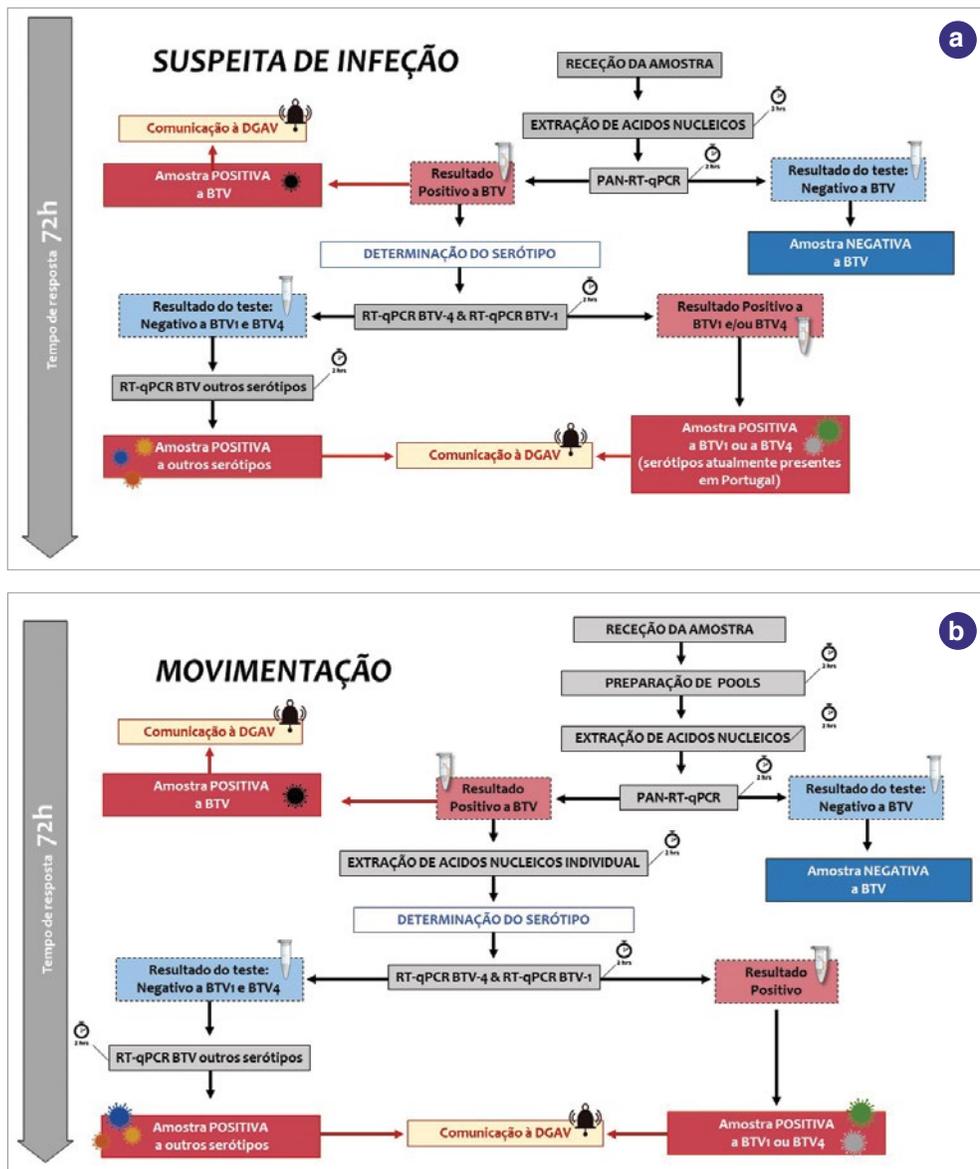


Figura 2: Fluxograma experimental aplicado ao diagnóstico do BTV (INIAV). (A) Suspeita clínica; (B) Animais para exportação, livres da doença.

levantamento das cadeias de infecção (epidemiologia molecular), dados essenciais à escolha da estirpe vacinal a ser aplicada ao efetivo nacional, e para a adaptação permanente dos métodos de diagnóstico molecular.

Anualmente, o INIAV participa em testes de proficiência internacionais, organizados pelo laboratório de referência Europeu (Laboratório Central de Veterinária de Madrid, Espanha). Estes testes per-

mitem aferir a qualidade e fiabilidade de resposta dos diferentes países Europeus, entre os quais Portugal, ao diagnóstico do BTV.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1. Diagnóstico Viroológico

Um teste molecular RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em tempo real) é um método

altamente sensível e específico que permite detetar e quantificar as moléculas de genoma viral presentes em amostras de sangue ou de órgãos de animais com suspeita clínica de infeção. Uma vez que há vários serotipos do vírus na Europa, o ensaio de RT-qPCR utiliza dois primers e uma sonda direcionados para genes muito conservados (*NS1* ou *NS3*), de forma a abranger a vasta gama de serotipos circulantes a nível europeu. Dado que ambos os genes estão sujeitos a baixas taxas de mutação, o sistema de diagnóstico permite a deteção de qualquer tipo de vírus presente. Esta abordagem metodológica, baseada num ensaio generalista denominado de PAN-RT-qPCR, diminui a probabilidade de se obterem resultados falsos-negativos (Fig. 2).

Quando se obtém um resultado positivo ao PAN-RT-qPCR, procede-se imediatamente à determinação do serotipo(s) dos vírus presente(s) na(s) amostra(s). Para tal utilizam-se RT-qPCR uniplex, específicos para cada um dos serotipos existentes. Estes testes têm como alvo o gene que codifica a proteína mais externa do virião, a VP2, um gene altamente variável e responsável pela existência dos diferentes serotipos virais (Fig. 2). A determinação do serotipo viral pode também ser realizada por seroneutralização, ainda que esta prova seja normalmente preterida em relação às metodologias moleculares, que apresentam maior rapidez de execução (2 horas versus 72 horas), maior simplicidade e automatização.

Devido à elevada sensibilidade do método RT-qPCR (Fig. 3-C, 3-D), e para efeitos de exportação ou pré-movimentação de animais livres da doença, é possível analisar um grupo de 5 amostras em simultâneo numa mesma reação de RT-qPCR, minimizando deste modo o custo das análises para o cliente e permitindo um rastreio mais rápido. Quando o resultado é positivo, as 5 amostras são posteriormente processadas individualmente para se identificar quais dos 5 animais são positivos.

Quando possível, procede-se ao isolamento do vírus em cultura de células BHK-21 (do Inglês, *Baby Hamster Kidney cells*) e/ou em ovos embrionados de galinha a partir de amostras positivas ao RT-qPCR que apresentem cargas virais elevadas (equivalentes a valores de *Ct* baixos) (Fig. 3-A, 3-B). Ainda que o RT-qPCR seja um método mais rápido do que o isolamento de vírus, este não o substitui totalmente em termos de informação biológica, uma vez que os testes que detetam o RNA viral, não indicam necessariamente, a presença de vírus infeccioso no sangue. Com efeito, em fases tardias da infeção, pode haver resultados positivos ao RT-qPCR que correspondem



Figura 3: Etapas do diagnóstico efetuado no laboratório de virologia do INIAV. (A) Isolamento de vírus em cultura de células *in vitro*; (B) Isolamento de vírus em ovos embrionados de galinha; (C) Preparação das reações de RT-qPCR; (D) Termocicladores para RT-qPCR.

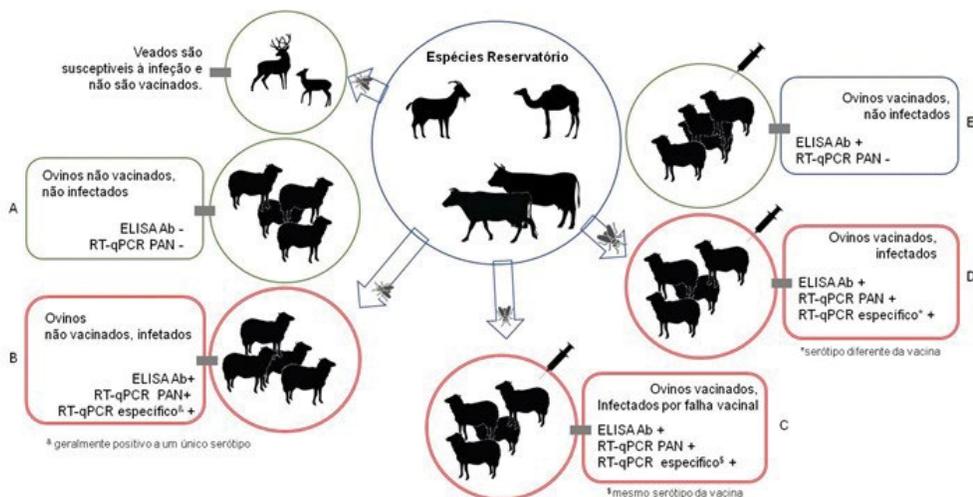


Figura 4: Esquema interpretativo dos resultados do diagnóstico laboratorial.
A- Nos ovinos não vacinados e não infectados, não se deteta RNA viral (RT-qPCR -) nem ocorre seroconversão (ELISA Ab -).
B- Os animais infectados, não vacinados, são geralmente ELISA Ab + e RT-qPCR +. No entanto, na fase inicial da infecção os animais são seronegativos (ELISA Ab -/RT-qPCR +). Para além disso, uma vez que a positividade a RT-qPCR na infecção é também transitória, em estádios avançados da infecção poderá não ser detetado RNA viral (RT-qPCR -/ELISA Ab +).
C- A vacina adotada numa determinada área geográfica contém o serotipo que circula. Se ocorrer falha vacinal, os animais são infectados com esse mesmo serotipo.
D- Uma vez que os serotipos não conferem imunidade cruzada, os animais vacinados contra um serotipo, podem ser infectados por um serotipo distinto. Se isso ocorrer os animais são ELISA Ac +/RT-q-PCR +, fazendo-se contudo as ressalvas apontadas no ponto B.
E- Os ovinos vacinados desenvolvem anticorpos para BTV mas são RT-qPCR negativos.

a vestígios de RNA viral e não a partículas infecciosas. Geralmente, estes valores de Ct são muito altos, indicativos de baixas cargas virais.

O aparecimento de novos serotipos ou de novas variantes virais é um desafio constante aos Laboratórios que executam o diagnóstico molecular da LA, sendo necessário aferir com regularidade a adequabilidade das sequências dos primers e sondas relativamente às sequências virais que vão sendo conhecidas e depositadas nas bases de dados públicas internacionais. No entanto, a participação frequente dos Laboratórios Nacionais em ensaios

de proficiência internacionais permite a validação dos métodos usados no diagnóstico de rotina e a sua constante atualização.

2. Diagnóstico Serológico

Os testes serológicos permitem detetar a resposta imunitária do animal ao vírus, nomeadamente a produção de anticorpos específicos para o BTV. A prova ELISA (do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é a técnica mais frequentemente utilizada. Esta prova aplica-se a soros individuais de ruminantes domésticos e selvagens, sendo utilizada principalmente

em animais sentinela no âmbito do programa de vigilância ativa da Língua Azul da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

Uma vez que não é possível distinguir animais vacinados de animais infectados, esta prova é aplicada a soros de animais sentinela (por norma bovinos e caprinos) não vacinados.

Conclusão

A complexidade da fisiopatologia da doença e o seu amplo espetro de hospedeiros, entre domésticos e selvagens torna o estudo da doença difícil (Figura 4). Os exames serológicos positivos são indicadores da exposição do animal ao vírus ou à toma da vacina, não sendo contudo possível, com base nestes testes, determinar se o animal está no momento infectado com o vírus, o que impossibilita a tomada de decisão sobre a movimentação de animais com serologia positiva, isto é, que fizeram seroconversão. Nesse sentido, os métodos moleculares de deteção de ácido nucleico viral (RNA) são essenciais para o diagnóstico laboratorial de uma infeção em curso.

A rápida deteção e determinação do serotipo do vírus responsável pelos surtos de LA, é muito importante para informar as autoridades veterinárias competentes sobre o tipo de vacina a administrar, e para desencadear o plano de contingência com vista à implementação de medidas para o controle eficaz da propagação da infeção. Tal como para a gripe nos humanos, a vacina só induz anticorpos contra os serotipos nelas contidos, não assegurando aos animais um estado de competência imunitária face a outros serotipos virais. Por esta razão, o sucesso das campanhas de vacinação depende do conhecimento antecipado do(s) serotipo(s) de vírus que circula(m) em cada país. VA

Referências:

- OIE, 2018. –Chapter 3.1.3. Bluetongue. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 8th edition.
- Lakshmi L., et al. *Standardization and application of real-time polymerase chain reaction for rapid detection of BTV*. 2018. *Veterinary World* 11(4), 452–458.
- Maan S., et al. *Development and evaluation of real time RT PCR assays for detection and typing of bluetongue virus*. 2016. *PLoS One* 11 (9), e0163014.
- Mertens PP., et al. *Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype*. 1989. *Virology* 170: 561–565.
- Barros SC, et al. *Molecular epidemiology of bluetongue virus in Portugal during 2004–2006 outbreak*. 2007. *Vet Microbiol.* 124(1-2):25-34.
- Barros SC., et al., *A DIVA system based on the detection of antibodies to nonstructural protein 3 (NS3) of Bluetongue virus*. 2009. *Vet Microbiol.* 12: 252-9.