



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS LAVAGENS  
SANITÁRIAS EM EMBRIÕES DE BOVINO PRODUZIDOS  
*IN VITRO* E INFECTADOS COM O SERÓTIPO 17 DO  
VÍRUS DA LÍNGUA AZUL**

Tese realizada por:

**Ana Rita da Costa Nunes de Brum Marques**

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo

2012



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS LAVAGENS  
SANITÁRIAS EM EMBRIÕES DE BOVINO PRODUZIDOS  
*IN VITRO* E INFECTADOS COM O SERÓTIPO 17 DO  
VÍRUS DA LÍNGUA AZUL**

Tese realizada por:

**Ana Rita da Costa Nunes de Brum Marques**

Mestrado em Engenharia Zootécnica

**Orientadores:** Prof. Doutor Joaquim Moreira da Silva

Doutora Brigitte Marquant-Le Guienne

Doutora Erica Baron

Angra do Heroísmo

2012

“Há sonhos que devem ser ressonhados, projectos que não podem ser esquecidos.”

*Hilda Hilst*

## AGRADECIMENTOS

Dedico este espaço àqueles que contribuíram para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Primeiramente agradeço a colaboração prestimosa de todo o grupo da UNCEIA (Maisons-Alfort – Paris), especialmente o grupo do laboratório de Fertilização *in vitro* (FIV), que me receberam de braços abertos e me apoiaram em tudo o que foi preciso, sendo sempre muito pacientes nomeadamente com as minhas dificuldades em francês.

À Doutora Brigitte Marquant-Le Guienne a minha imensa gratidão por me ter recebido em sua casa e orientado não só a nível do trabalho em si, mas também com dicas de grande utilidade que me ajudaram durante os tempos em Paris. Sou-lhe grata também, por mesmo depois de eu terminar o estágio ter-se mantido disponível para me ajudar com as dúvidas que surgiram.

À Doutora Laetitia Clement o meu reconhecimento pela paciência, simpatia e ajuda na realização do trabalho de laboratório.

O meu muito obrigado a Isabelle Sportiello, bibliotecária da UNCEIA, por me ter ajudado fornecendo alguns documentos da minha pesquisa bibliográfica, que de outra forma dificilmente teria acesso.

Pela dedicação, bem como pela amizade e palavras de encorajamento que ajudaram muito no desempenho deste trabalho, o meu reconhecimento para com o Doutor Joaquim Moreira da Silva e a Doutora Erica Baron, sempre disponíveis e pacientes.

Estou de igual modo agradecida à Doutora Isabel Carvalhais e à Doutora Marwa Faheem, bem como aos restantes membros do grupo de reprodução da Universidade dos Açores que sempre estiveram disponíveis para me ajudar, animar e aconselhar.

Sou eternamente grata aos meus familiares pelo incentivo e apoio incondicional recebido ao longo de todo o meu percurso académico.

Por último, mas não menos importante, quero também de referir o meu profundo e sentido reconhecimento aos meus amigos mais próximos que me apoiaram ao longo desta etapa da minha vida e aos que conheci no decorrer desta caminhada, que com a sua simpatia e boa disposição, ajudaram a torna-la mais fácil.

## ABSTRACT

The bluetongue (BTV) is an epizootic disease of viral etiology affecting ruminants. It is transmitted by a vector and is included in the list of notifiable diseases in the European and National Health Code for terrestrial animals of the World Organization for Animal Health (OIE).

With this work we sought to assess, through quantitative real-time PCR (qRTi-PCR), if the virus of this disease (BTV-17) infects the oocytes used for *in vitro* embryo's production, observe if the International Embryo Transfer Society (IETS) protocol for washing embryos, before transferring is effective for the decontamination of bovine embryos, previously exposed to different concentrations experimentally by BTV-17 and in finally evaluate if contaminating oocytes with BTV-17 can affect fertilization and the further development of the zygote to seven days after fertilisation.

For such purpose, in the laboratory of *in vitro* fertilization (IVF) of UNCEIA located in Maisons-Alfort, Paris, a total of 1124 bovine oocytes were used in four sessions and divided in three groups:

Group I – Control Group (210 oocytes);

Group II – Experimental group in which 623 oocytes were contaminated with BTV-17 and 100 contaminated with BTV-8;

Group III – Experimental group in which 191 oocytes were cultured only with the media used for the oocyte's contamination in the Group II (MEM), without the virus.

Oocytes belonging to Group II were divided in:

Group II a), in which oocytes (n=207) were contaminated with BTV-17 ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL);

Group II b), in which oocytes (n=207) were contaminated with BTV-17 ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL);

Group II c), in which oocytes (n=209) were contaminated with BTV-17, ( $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL);

Group II d), in which oocytes (n=100) were contaminated with BTV-8 ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL).

Before dividing oocytes in the different groups, a total of 90 of them were used to confirm that none were contaminated with BTV.

After contamination oocytes were matured, fertilized and cultured *in vitro* for seven days, after which, embryos were evaluated and washed according to the procedure recommended by the IETS (10 washings) and then the virus were evaluate on embryos and on the washing media by using the *Bluetongue Virus Kit TaqVet*® *All Genotypes* and resorted to qRTi-PCR. A total of 234 embryos were produced in the control, group contaminated with BTV-17 and group with MEM. For the group in which oocytes were contaminated with BTV-8, a total of 20 embryos were produced. No statistical differences between the different groups considered were observed.

It can be concluded that: the virus infects the oocytes used in *in vitro* production of embryos, even those with intact pellucid zone pellucid; the 10 washes protocol purposed by IETS before transfer are not sufficient to eliminate the virus from the embryos; the virus BTV-17 does not affect fertilization and development of the zygote, in the three different concentrations tested, up to day 7. As the virus is not eliminated during the washing and it is not affecting embryo development, it can be a source of cross-infection via embryo transfer in healthy animals.

**Keywords:**

Bluetongue; Bovine embryos; BTV-17; pellucid zone, sanitary washes; qRTi-PCR.

## RESUMO

A língua azul (BT) ou febre catarral ovina (FCO) é uma doença epizootica de etiologia vírica que afecta os ruminantes. É de transmissão vectorial e está incluída na lista de doenças de declaração obrigatória nacional e europeia, e no código sanitário para os animais terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

Com a realização deste trabalho pretendeu-se: aferir, através de PCR-quantitativo em tempo real (qRTi-PCR), se o vírus contamina os ovócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões; verificar se o protocolo da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) de lavagem de embriões antes da sua transferência é efectivo para a descontaminação desses embriões quando expostos a diferentes concentrações de BTV-17 através de qRTi\_PCR e avaliar se o vírus BTV-17 afecta a fertilização e o posterior desenvolvimento embrionário até ao sétimo dia após a fertilização.

Para isso, no laboratório de fertilização *in vitro* (FIV) da “UNCEIA” localizado em Maisons-Alfort, Paris, utilizaram-se um total de 1124 ovócitos de bovino, usados em quatro manipulações e divididos em três grupos:

Grupo I – Grupo Controlo (210 ovócitos);

Grupo II – Grupo experimental em que 623 ovócitos foram contaminados com BTV-17 e 100 com BTV-8;

Grupo III – Grupo experimental em que 191 ovócitos foram cultivados em meio MEM, sem a presença de vírus.

Os ovócitos pertencentes ao Grupo II foram divididos em:

Grupo II a), em que os ovócitos (n=207) foram contaminados com BTV-17 ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL);

Grupo II b), em que os ovócitos (n=207) foram contaminados com BTV-17 ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL);

Grupo II c), em que os ovócitos (n=209) foram contaminados com BTV-17, ( $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL);

Grupo II d), em que os ovócitos (n=100) foram contaminados com BTV-8 ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL).

Antes de serem divididos em diferentes grupos, um total de 90 ovócitos foram usados para confirmar se nenhum estava contaminado com o vírus BTV.

Após a contaminação, os ovócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* durante sete dias, após o que os embriões foram avaliados recorrendo a critérios morfológicos e lavados de acordo com as regras da IETS, sendo posteriormente avaliada presença do vírus da língua azul quer nos embriões, quer no líquido de lavagem, utilizando o *Kit TaqVet® Bluetongue Virus All Genotypes* e a qRTi-PCR. No total, 234 embriões foram produzidos no grupo controlo, no contaminado com BTV-17 e no grupo em que os ovócitos foram cultivados em MEM. Para o grupo em que os ovócitos foram contaminados com BTV-8, um total de 20 embriões foram produzidos. Não foram observadas diferenças significativas para a produção de embriões para os diferentes grupos.

Com este trabalho concluiu-se que: o vírus contamina os ovócitos utilizados na produção de embriões *in vitro*, mesmo estes tendo a zona pelúcida intacta; as 10 lavagens do protocolo IETS antes da transferência não são suficientes para que o vírus seja eliminado dos embriões; o vírus BTV-17 não afecta a fertilização e o desenvolvimento do zigoto, nas concentrações testadas, até o 7º dia. Assim sendo, uma vez que o vírus não é eliminado nas lavagens e não afecta o desenvolvimento do embrião pode ser fonte de infecção cruzada via transferência de embriões (TE) em animais sãos.

#### **Palavras-chave:**

Língua azul; BTV-17; embriões bovinos; zona pelúcida; lavagens sanitárias; qRTi-PCR.

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	II
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE GERAL.....	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE QUADROS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJECTIVOS.....	4
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 - Vírus da BTV e Vectores Culicoides.....	5
3.2. - Características genéticas do vírus da doença da língua azul bovina.....	8
3.3 - Ciclo de vida do vector Culicoides .....	9
3.4 – Sinais Clínicos.....	11
3.5 - Outras Possíveis Vias de Transmissão.....	14
3.6 – Medidas de controlo, segurança e prevenção da BTV .....	17
3.6.1- Vacinação.....	19
3.6.2 – Controlo do vector.....	19
3.7 - Protocolo das lavagens sanitárias recomendadas pelo IETS .....	20
IV – MATERIAIS E METODOS.....	23
4.1 - Produção de embriões in vitro: .....	25
4.1.1 -Recolha e Maturação de ovócitos in vitro .....	25
4.1.2 - Capacitação in vitro de sémen de bovino .....	26
4.1.3 - Fertilização in vitro.....	27
4.1.4 - Cultura de embriões in vitro .....	28
4.1.5 – Clivagem .....	28
4.2 - Contaminação experimental com o serótipo BTV-17: .....	29

4.3 - Procedimento de lavagens sanitárias recomendado pelo IETS.....	29
4.3. 1 - Recolha e armazenamento de amostras de sanitárias .....	30
4.4 - Detecção do genoma viral.....	31
4.4.1 - Extracção e purificação de RNA viral .....	32
4.4.2 – A desnaturação e amplificação de RNA Viral: desnaturação e amplificação.....	33
4.4.3 - Interpretação dos resultados da qRTi-PCR.....	35
4.5- Análise estatística.....	36
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
VII - (a) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
VII - (b). REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ELECTRÓNICAS .....	60

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I – PBS	I
Anexo II – Meio de Colecta dos ovócitos	II
Anexo III - Meio de Maturação	II
Anexo IV – Mistura PHE	III
Anexo V – Meio FIV	III
Anexo VI – Meio IVFTL	IV
Anexo VII – Quadro de diluição do esperma	V
Anexo VIII - Meio de cultura	VI
Anexo IX - Meio MEM ( <i>Minimal essential medium</i> )	VII
Anexo X: Edital n.º 29/2011 – Febre Catarral Ovina/Língua Azul	IX
Anexo XI: 2012/C 46 E/02	XIII

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Distribuição mundial dos serótipos do vírus da língua azul e dos vectores primários <i>Culicoides</i> nas diferentes regiões geográficas de acordo com Tabachnick (2010).	5
<b>Figura 2:</b>	Fêmea de <i>Culicoides</i> grávida (Saegerman <i>et al.</i> , 2008; Fotografia: Reginald De Deken and Maxime Madder).	6
<b>Figura 3:</b>	Partículas do vírus da língua azul. Microscopia electrónica. Ampliada	7

78.000x em células de rim de borrego (MicrobeLibrary.org; Foto de Walton et Buch).

- Figura 4:** Esquema ilustrativo da estrutura do vírus da língua azul. (Adaptado do Swiss Institute of Bioinformatics). 8
- Figura 5:** Ciclo de vida dos *Culicídeos* (Adaptado de Purse *et al.*, 2005). 10
- Figura 6:** Ciclo de transmissão do BTV (Adaptado de Purse *et al.*, 2005). 15
- Figura 7:** A transmissão do vírus da língua azul, mostrando possíveis rotas secundárias de transmissão. (Imagem adaptada de Wilson *et al.*, 2009). 16
- Figura 8:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus para  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17. 38
- Figura 9:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17. 40
- Figura 10:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus para  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-8. 41
- Figura 11:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus para  $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17. 43
- Figura 12:** Resultados em Ct da qRTi-PCR, da presença ou ausência de vírus BTV de acordo com as diferentes concentrações de BTV, no líquido de lavagem, nas três primeiras e três últimas lavagens sanitárias e nos embriões após os procedimentos de lavagem sanitários recomendados pela IETS. 44

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b>	Etapas do programa de amplificação de qRTi-PCR.	35
<b>Quadro 2:</b>	Interpretação dos resultados de qRTi-PCR (LSI, 2011).	36
<b>Quadro 3:</b>	Resultados da Média $\pm$ DP, relativos ao desenvolvimento dos embriões nos diferentes tratamentos. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão dos resultados de 4 manipulações ( $P > 0.05$ ).	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Afssa - *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*

AVE – tampão AVE

AVL – tampão *Viral lysis*

AW – tampão de lavagem/*wash buffer*

BHK-21 – *cells baby hamster kidney*

BSA - *bovine serum albumin*

BT – *bluetongue*/ língua azul

BTV - *bluetongue vírus*/ vírus da língua azul

CIV – cultura *in vitro*

COC - complexos *cumulus-ovócitos*

Ct - *cycle Threshold*

DIV - desenvolvimento *in vitro*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

cDNA - *complementary deoxyribonucleic acid*

EHD - doença hemorrágica epizoótica dos veados

TE – transferência embrionária

FCO – febre catarral ovina

FIV – fertilização *in vitro*

FSH – hormona folículo-estimulante

IETS - *International Embryo Transfer Society*

INRA - *Institut National de la Recherche Agronomique*

IVFTL – TL - *fertilization medium*

LSI - *Laboratoire Service International*

MEM - *minimal essential medium*

MIV - *maturação in vitro*

NCS - *controle negativo (negative control sample)*

NS – *proteínas não estruturais*

PBS - *phosphate buffered saline*

PCR - *polymerase chain reaction*

PHE - *penicillamine, hypotaurine e epinephrine*

PIV - *produção de embriões in vitro*

PF2 $\alpha$  - *prostaglandina F2 $\alpha$*

qRTi-PCR - *quantitative real-time PCR*

RNA - *ribonucleic acid*

RNase - *ribonuclease*

SOF – *synthetic oviduct fluid*

SPZ – *espermatozóides*

SVF – *soro fetal de bezerro*

TALP - *tyrode's albumin lactate pyruvate*

TCID – *Tissue culture infective dose*

TL - *tampão lise*

UNCEIA - *Unión Nationale des Coopératives Agricoles d'Élevage et d'Insemination Artificielle)*

VP - *proteínas do capsídeo viral*

ZP – *zona pelúcida.*

# I. INTRODUÇÃO

A língua azul (BT) ou febre catarral ovina (FCO) é uma doença epizootica de etiologia vírica que afecta os ruminantes. É de transmissão vectorial e está incluída na lista de doenças de declaração obrigatória nacional e europeia e no código sanitário para os animais terrestres da World Organisation for Animal Health (OIE) (Pombo, 2011).

O nome língua azul deriva da cianose da língua que é frequentemente observada em ovinos afectados por esta doença (Vega *et al.*, 2004).

Esta doença, normalmente transmitida por dípteros do género *Culicoides*, afecta tanto ruminantes domésticos como selvagens (Tomich *et al.*, 2006).

Historicamente, a distribuição global do vírus da língua azul (BTV) tem sido confinada entre as latitudes aproximadas de 53°N e de 34°S, com uma extensão recente no Norte da Europa (OIE, 2010).

A língua azul foi relatada pela primeira vez em 1881 por Hutcheon, mas foi Spreull (1905) o primeiro a estudar a doença em detalhe. Descoberta na África do Sul aquando da introdução das primeiras ovelhas Merino, pensa-se, no entanto, que a infecção era provavelmente endémica em ruminantes africanos selvagens desde a antiguidade (Hutcheon, 1902; Vega *et al.*, 2004).

Em França, o principal vector, *Culicoides imicola*, (*C. imicola*) foi detectado pela primeira vez na Córsega, em Outubro de 2000, algumas semanas antes dos surtos do serótipo 2 do BTV (BTV-2). A vigilância entomológica foi implementada na Córsega e na França continental em 2002 (Baldet *et al.*, 2004).

No segundo semestre de 1956 houve uma epidemia de língua azul no sul de Portugal e sudoeste Espanha, que resultou em perdas extensas entre as ovelhas e que também afectou algum gado bovino (Manso-Ribeiro *et al.*, 1957; Campano, 1957). Esse foi, de acordo com Nunes *et al.* (2009), o primeiro surto de língua azul em Portugal e foi causado pelo serótipo BTV-10 do vírus, tendo a doença sido declarada erradicada em 1960. Quarenta e quatro anos depois, em Novembro de 2004, a doença BT re-ocorreu em Portugal, causada pelo BTV-4, e novamente, em Setembro de 2007, pelo BTV-1 (Nunes *et al.*, 2009).

O *C. imicola* é considerado o principal vector da doença BT em Portugal (Nunes *et al.*, 2009). As evidências favorecem a ideia de que a língua azul terá chegado a Portugal por mosquitos transportados pelo vento (Sellers *et al.*, 1978 e Gibbs *et al.*, 1994), a partir de Marrocos.

Para os diversos serótipos de BTV, parecem sempre ser as células endoteliais do sistema vascular e as células do sistema linforreticular, as estruturas primeiramente afectadas. A infecção em linfonodos locais produz a primeira viremia que infectará outros linfonodos, baço, medula e tecidos do organismo onde o vírus se replica ao nível do sistema micro vascular resultando nas alterações patológicas características da doença (Smith, 2006)

O BTV-17, sobre o qual trata este trabalho, é endémico nos Estados Unidos (Barber, 1979; Bowen *et al.*, 1982 e Rossitto *et al.*, 1992) onde foi isolado, de acordo com Walton (2004), em 1962, tendo como principal vector o *Culicoides sonorensis*. Assim, este trabalho surgiu no âmbito das dificuldades sentidas no comércio de embriões entre a Europa e os Estados Unidos e na escassez de estudos sobre o serótipo 17 do BTV na Europa. Pretendeu-se assim avaliar os riscos existentes relativamente ao BTV-17 no que toca ao comércio de material genético, neste

caso em particular embriões, tendo em conta que a eficácia das lavagens sanitárias propostas pelo *International Embryo Transfer Society* (IETS) parece variar dentro dos diferentes serótipos.

Neste trabalho recorreu-se ao PCR quantitativo em tempo real (qRTi-PCR) para verificar a presença ou ausência do vírus nos embriões após as lavagens sanitárias propostas pelo IETS.

## II. OBJECTIVOS

Com a realização deste trabalho pretendeu-se:

- Aferir, através de PCR quantitativo em tempo real (qRTi-PCR), se o vírus BTV-17 pode contaminar ovócitos utilizados na produção de embriões *in vitro*;

- Avaliar se este vírus afecta a capacidade de fertilização e posterior desenvolvimento do zigoto durante um período de sete dias;

- Verificar se o protocolo proposto pela IETS para a lavagem de embriões antes da transferência é efectivo para a sua descontaminação, quando estes forem expostos, *in vitro*, a diferentes concentrações de BTV-17;

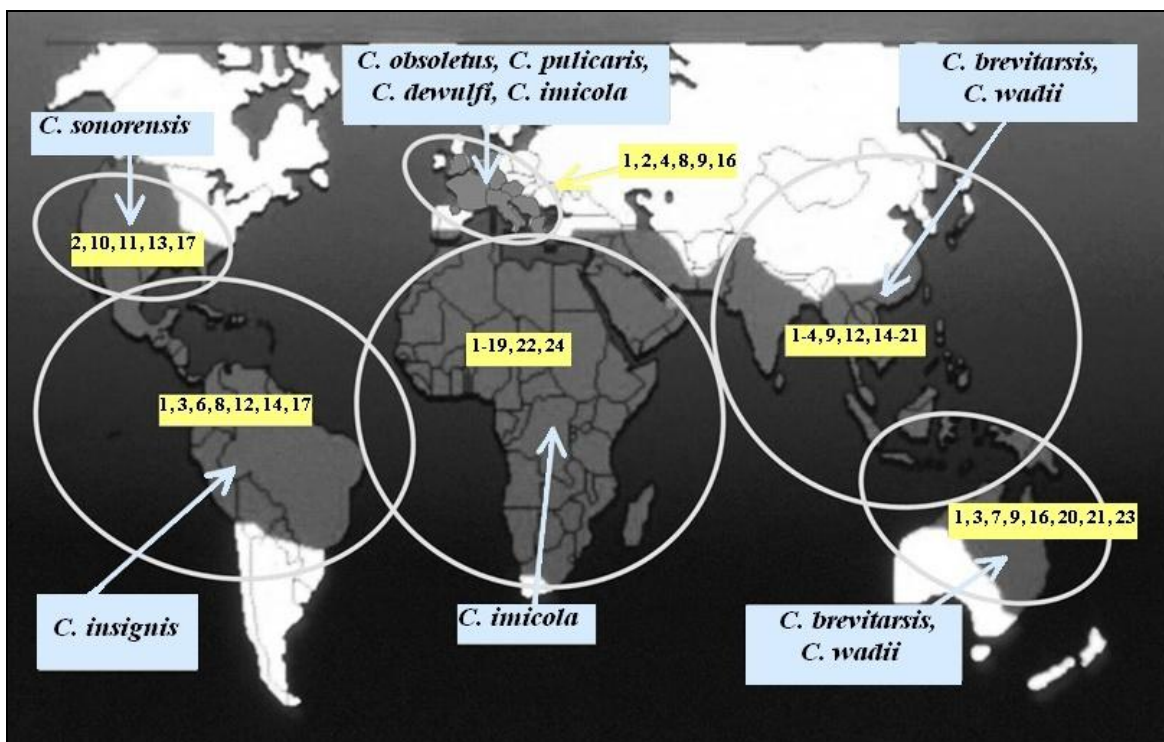
- Analisar assim o risco de transmissão de BTV-17 através da metodologia de transferência de embriões, amplamente utilizada na indústria de melhoramento genético.

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - Vírus da BTV e Vectores Culicoides

O vírus da língua azul é um vírus do género *Orbivirus*, subfamília *Sedoreovirinae* e família *Reoviridae*.

*Culicoides* são insectos hematófagos dos quais existem mais de 1400 espécies, mas apenas alguns deles são capazes de transmitir a infecção (Figura 1), como por exemplo: *C. imicola* e *C. bolitinos* em África, *C. imicola* no sul da Europa, *C. variipennis*, *C. sonorensis* e *C. insignis* para a América e *C. fulvus* para a Austrália. No entanto, outras espécies são fortemente suspeitas de desempenhar um papel importante na transmissão, incluindo para a Europa, como é o caso do *C. pulicaris* e do *C. Obsoletus* (Fu *et al.*, 1999; Afssa, 2005).



**Figura 1:** Distribuição mundial dos serótipos do vírus da língua azul e dos vectores primários *Culicoides* nas diferentes regiões geográficas de acordo com Tabachnick (2010).

Vinte e quatro serótipos diferentes do BTV são conhecidos há décadas, pensando-se que qualquer um pode causar a doença da língua azul em ruminantes. Dois serótipos adicionais de BTV, BTV-25 (Toggenburg Orbivirus, da Suíça) (Hofmann *et al.*, 2008) e BTV-26 (do Kuwait) (Maan *et al.*, 2011) foram recentemente identificados em caprinos e ovinos, respectivamente.

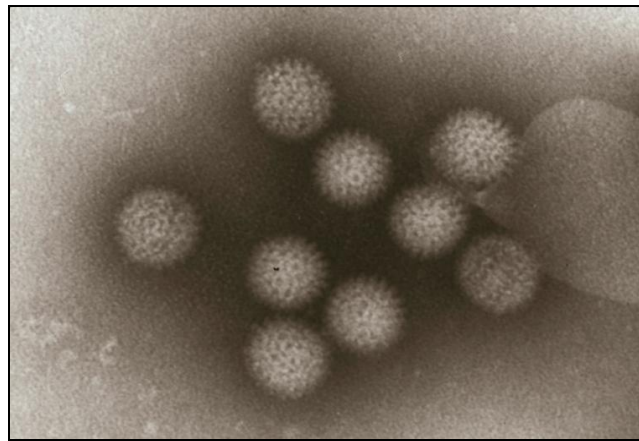
Os vectores *Culicoides* são fundamentais para a sobrevivência e transmissão da BTV visto a infecção não ser considerada contagiosa e não existirem provas credíveis da manutenção a longo prazo da BTV em ruminantes. Tanto as infecções BTV sub-clínicas como a manifestação clínica da doença BT geralmente ocorrem durante o final do Verão e início do Outono, quando o número de insectos vectores é mais elevado em áreas endémicas de BTV (Stott *et al.*, 1983).

Os insectos vectores (Figura 2) só podem transmitir BTV aos ruminantes susceptíveis (não imunes à doença) após um período de incubação extrínseco de aproximadamente 10 a 14 dias, período durante o qual o vírus é disseminado a partir do intestino do insecto para as suas glândulas salivares. O período de incubação externa é menor quando os insectos são mantidos em elevadas temperaturas ambiente, sendo que num estudo com *Culicoides sonorensis* e BTV-9, Carpenter *et al.* (2011) chegaram a resultados de três dias a 30°C, quatro dias a 25°C, cinco dias a 20°C e 20 dias a 15°C. A temperatura ambiente tem um efeito profundo sobre a sobrevivência dos insectos vectores, assim como nas suas actividades de alimentação e replicação do vírus (MacLachlan, 2004).



**Figura 2:** Fêmea de *Culicoides* grávida (Saegerman *et al.*, 2008; Fotografia: Reginald De Deken and Maxime Madder).

A introdução de BTV (Figura 3) a partir de uma área para outra pode ocorrer de quatro formas: através do movimento animal (ruminantes domésticos e selvagens) ou transporte de produtos animais (sêmen, embriões); pelo transporte do vector *Culicoides spp.* infectado realizado por seres vivos (plantas e animais) ou inanimados (aviões, navios); por meio do voo activo do vector *Culicoides spp.* infectado (propagação local), e pelo voo passivo com o vento (responsável pela difusão de longa distância) (Saegerman *et al.*, 2008).



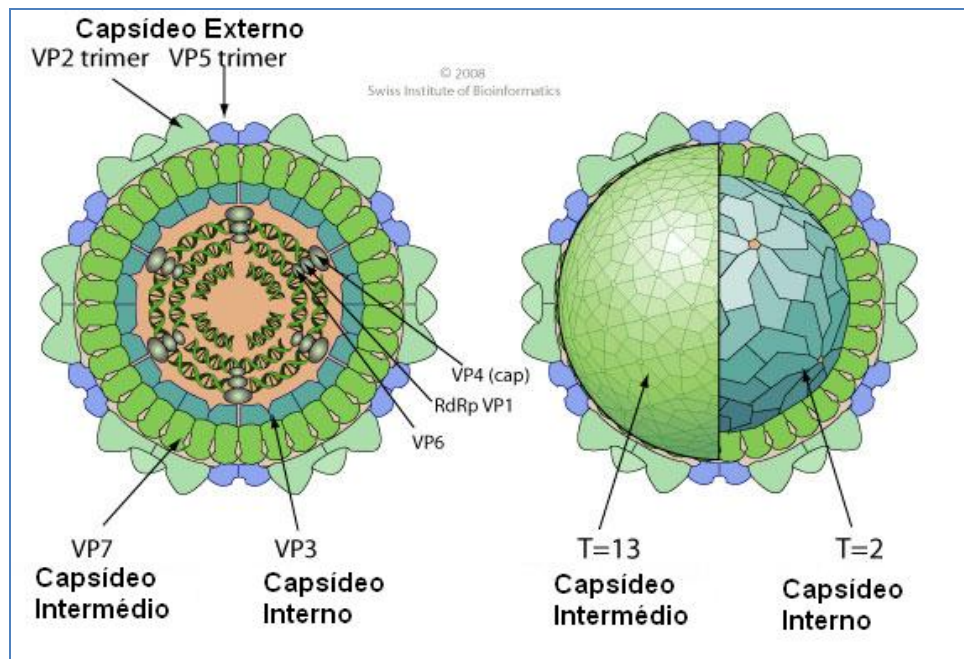
**Figura 3:** Partículas do vírus da língua azul. Microscopia electrónica. Ampliada 78.000x em células de rim de borrego (MicrobeLibrary.org; Foto de Walton and Buch).

O vírus do BTV pode sobreviver 9-12 meses, na ausência de vectores adultos, com nenhum caso detectável da doença, viremia, ou soroconversão no hospedeiro. A sobrevivência do vírus de uma ‘temporada de vector’ para a próxima chama-se ‘hibernação’, mas o mecanismo envolvido não é totalmente compreendido (Takamatsu *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2008).

Várias espécies de *Culicoides* de comprovada competência na transmissão do BTV alimentam-se preferencialmente em bovinos que em ovelhas, como é o caso do *C. brevitarsis*, *C. wadai* e *C. fulvus* (Gibbs *et al.*, 1988).

### 3.2. - Características genéticas do vírus da doença da língua azul bovina

A família *Reoviridae* à qual o vírus da Língua Azul pertence, tem como características mais relevantes a cadeia dupla de RNA dividida em 10 a 12 segmentos independentes e simetria icosaédrica (Figura 4). Dentro desta família, o BTV é o protótipo do género *Orbivirus* (IICA, 1986).



**Figura 4:** Esquema ilustrativo da estrutura do vírus da língua azul. (Adaptado do Swiss Institute of Bioinformatics [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/106.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/106.html), Acedido em 10 de Fevereiro de 2012).

A partícula viral mede aproximadamente 80nm de diâmetro e compreende um nucleocapsídeo de 63nm de diâmetro. Não tem envelope lipoproteico sendo o nucleocapsídeo apenas cercado por uma membrana composta por uma camada proteica. A partícula viral possui 4 séries de proteínas que formam o capsídeo, 10 a 12 segmentos de RNA e de proteínas (Luigi,

2003). As variações nas proteínas que formam o capsídeo externo-VP2 e, em menor grau, o VP5, permitem determinar o serótipo (Wilson *et al.*, 2009).

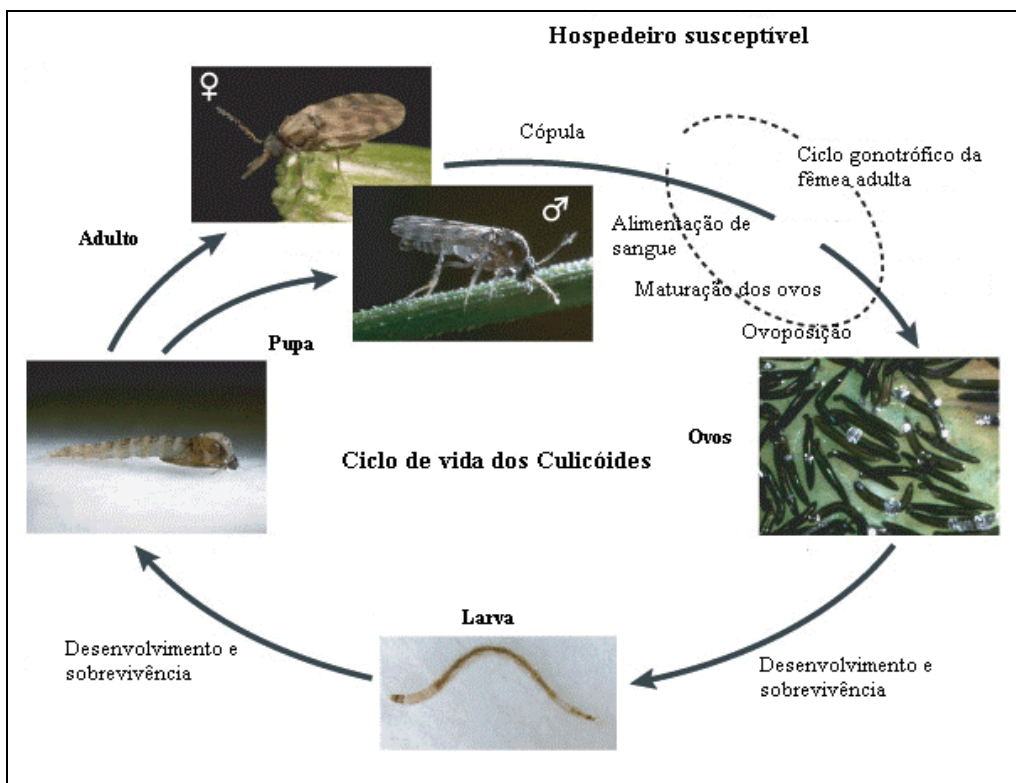
As três camadas, interna, intermédia e externa, são formadas por proteínas distintas (Mertens *et al.*, 2004), sendo a camada externa composta por duas proteínas estruturais, 60 trómeros de VP2 (111kDa) e 120 trómeros de VP5 (59kDa). A camada intermediária é composta pelas principais proteínas estruturais imuno-dominantes VP7 (38kDa), organizadas em 260 trómeros (Nason *et al.*, 2004). O capsídeo interno é composto pela proteína VP3 (Mertens *et al.*, 2004). A proteína VP7 é a proteína estrutural comum aos diferentes serótipos virais (Zientara *et al.*, 2002).

As proteínas não-estruturais (NS1, NS2, NS3 e NS3A) provavelmente participam no controlo da replicação do vírus da língua azul, maturação e exportação da célula infectada (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008). A sequência das proteínas não estruturais é mais conservada entre os serótipos, enquanto, a das proteínas mais externas, principalmente a VP2 e VP5, presentes no capsídeo viral, são muito variáveis (Roy, 1989).

### **3.3 - Ciclo de vida do vector *Culicoides***

O género *Culicoides* pertence ao reino *Animalia*, ao filo *Arthropoda*, à classe *Insecta*, à ordem *Diptera*, à família *Ceratopogonidae* e à subfamília *Ceratopogoninae* (Ahid, 2009; Perie *et al.*, 2005). Os *Culicoides* têm um desenvolvimento *holometabolous*, com a presença de várias fases larvares, uma alteração do tipo *orthorhaphé* (emergência dos adultos a partir da ninfa através de uma abertura rectilínea em T), e uma hematofagia restrita somente às fêmeas adultas (Perie *et al.*, 2005).

Os insectos com desenvolvimento *holometabolous* são ‘caracterizados pelos indivíduos imaturos serem completamente diferentes dos adultos na sua forma e na sua ecologia’ (Bourassa, 1991). O ciclo de vida processa-se do seguinte modo (Figura 5): a fêmea deposita os ovos num local húmido. Os ovos possuem uma forma alongada, sendo muito claros no momento da postura e escurecendo rapidamente em contacto com o ar. Habitualmente são depositados em folhas em decomposição, em buracos de árvores, na zona de interface água/solo (lamas de charcos, barragens e pequenos cursos de água), e em estrume e excrementos de animais domésticos e silvestres, tudo dependendo da espécie de *Culicíoides* em questão (Rodrigues, 2008).



**Figura 5:** Ciclo de vida dos *Culicíoides* (Adaptado de Purse *et al.*, 2005).

A ecologia de *Culicoides* é altamente dependente das condições climáticas (temperatura, humidade) e espécies consideradas. Em geral, a vida é curta nos adultos (10-20

dias), mas podem viver por períodos de tempo mais longos, entre 1,5 e 3 meses. No entanto, o processo de desenvolvimento do ovo ao adulto demora cerca de 3 semanas (dependendo das temperaturas externas), os ovos (2 a 9 dias), as quatro fases larvais (14 a 25 dias) e a fase de pupa (3 a 10 dias). A duração da vida larvar pode ser prolongada no Inverno durante vários meses nos países frios e temperados, com amplitude térmica anual marcada (Augot *et al.*, 2010).

Os *Culicoides* adultos são crepusculares, e, portanto, o pico da actividade é em torno do pôr-do-sol e ao nascer do sol e, em menor grau, durante a noite. Algumas espécies picam durante o dia. As refeições de sangue ingeridas pelas fêmeas permitem o amadurecimento dos ovos. As fêmeas realizam voo para procurar um macho, uma refeição de sangue, ou um local de oviposição. Os machos não se alimentam de sangue; são fitófagos, alimentando-se de néctar de flores, açúcar, líquidos de decomposições e excrementos (Rodrigues, 2008).

Dependendo da espécie de *Culicoides*, os animais de que se alimentam são diferentes: alguns alimentam-se de sangue humano, outros de aves, como *Culicoides arakawae*, mas os insectos vectores da língua azul alimentam-se principalmente de bovinos (Perie *et al.*, 2005).

Em todo o mundo, mais de 50 vírus foram isolados de *Culicoides* (Mellor, *et al.*, 2000): vinte vírus da família *Bunyaviridae*, 19 pertencentes aos *Reoviridae* (como o vírus da língua azul) e 11 da família *Rhabdoviridae* (Perie *et al.*, 2005).

### **3.4 – Sinais Clínicos**

As ovelhas são mais sensíveis à doença do que o gado bovino e as raças europeias são geralmente mais severamente afectadas que os seus homólogos africanos (MacLachlan, 2004). A

doença também ocorre esporadicamente em camelídeos do Sul da América, e até mesmo carnívoros (Darpel *et al.*, 2007; Jauniaux *et al.*, 2008 e Meyer *et al.*, 2009).

Visto tratar-se geralmente de uma doença mais grave em ovinos do que em bovinos, há ainda desacordo quanto à extensão dos efeitos clínicos da língua azul em bovinos. É geralmente aceite que, na maioria dos animais adultos infectados os sinais são inaparentes (Bagley, 1997).

Nos ovinos, a gravidade da doença varia de acordo com a raça das ovelhas, estirpe do vírus e *stress* ambiental (The Center for Food Security & Public Health, 2006).

Três ou quatro semanas após a recuperação, algumas ovelhas sobreviventes podem perder alguma ou toda a lã. O recrudescimento da doença clínica tem sido relatado em ovinos (The Center for Food Security & Public Health, 2006). Sinais clínicos da doença BT em ovinos são principalmente atribuíveis à permeabilidade vascular e incluem hiperémia, febre, congestão, edema facial, hemorragias e a erosão das membranas mucosas. No entanto, em casos leves da doença, uma hiperémia ocular transitória e ligeira e descarga nasal pode ser observada. Em casos muito graves a língua pode apresentar hiperémia tornar-se edematosa e projectar-se da boca, ou tornar-se cianótica. A hiperémia pode estender-se para outras partes do corpo, especialmente para a banda coronária dos cascos, virilhas, axilas e períneo. Em casos graves há, adicionalmente, degeneração muscular, esquelética e cardíaca (OIE, 2010). Nos casos em que os bovinos atacados com a síndrome da língua azul apresentam sinais clínicos, verifica-se hipertermia transitória com 40-41°C (Luigi, 2003).

Porém, tendo em conta que as infecções em bovinos são geralmente subclínicas, muitas vezes, os únicos sinais da doença são as alterações na contagem de leucócitos e uma flutuação na temperatura corporal. Raramente, o gado tem hiperémia leve, vesículas e úlceras na boca, hiperémia em volta da banda coronária; hiperestesia, ou dermatite vesicular e ulcerativa. A pele

pode desenvolver dobras de espessura, especialmente na região cervical. As narinas externas podem conter erosões e exsudado ressequido. A esterilidade temporária pode ser vista em touros. As vacas infectadas podem dar à luz bezerros com hidranencefalia ou quistos cerebrais. O gado bovino que tem a doença clinicamente pode desenvolver rupturas graves nos cascos várias semanas após a infecção, que são normalmente seguidas pela podridão do casco. As infecções em cabras são geralmente subclínicas, e semelhantes à doença em bovinos (The Center for Food Security & Public Health, 2006).

Segundo Bagley, (1997), podem ser consideradas três situações diferentes da BT em bovinos: os efeitos na reprodução; defeitos congênitos (que dão origem a bezerros fracos e com deformações) e gado persistentemente infectado. Um estudo sobre bovinos leiteiros em África do Sul mostra uma queda da produção leiteira de 42% durante um mês após a infecção (Luigi, 2003).

A infecção pré-natal de fetos de ovinos e bovinos num estágio inicial de desenvolvimento pode levar à morte embrionária. Fetos infectados durante a última fase da gestação sobrevivem e desenvolvem anticorpos, não ficando persistentemente infectados (Parsonson, 1992).

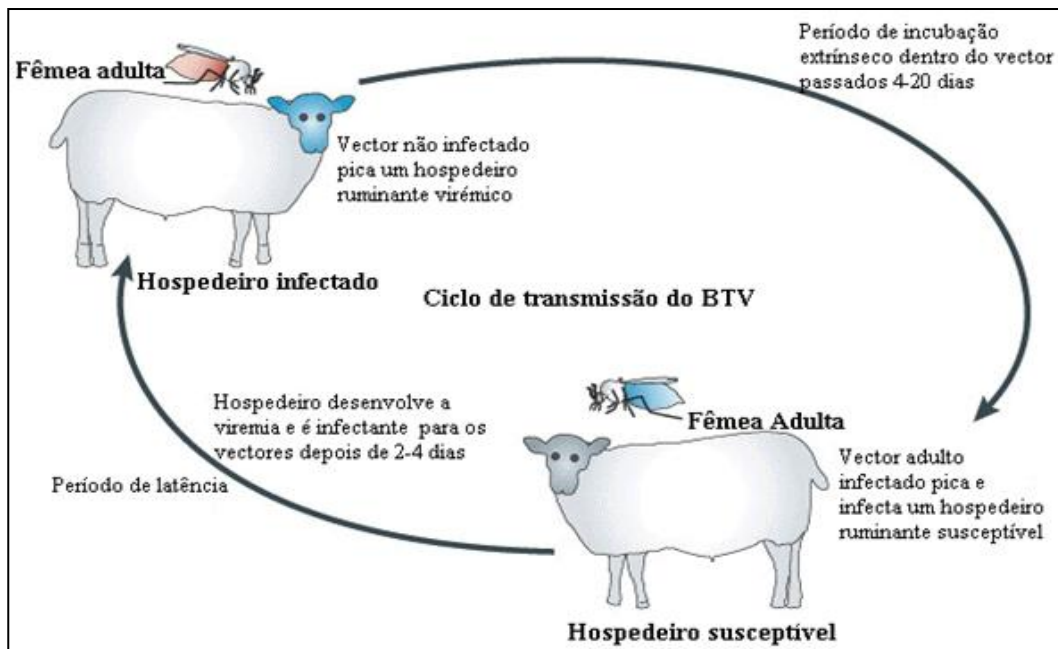
Infecções fetais de bovinos, causadas por vírus da língua azul (BTV) só foram relatadas nos Estados Unidos e em África do Sul e têm sido associados ao uso de vacinas vivas modificadas (MacLachlan *et al.*, 2000). A hidranencefalia, ausência quase completa do parênquima cerebral, induzida pela infecção com o vírus da língua azul vivo e modificado que atravessa a placenta tem sido relatada em ovinos e raramente também em bovinos nos EUA e na África do Sul (Vercauteren *et al.*, 2008). Como as células precursoras neuronais e gliais só estão presentes em fetos muito jovens (entre 70 e 85 dias de gestação em bovinos), a ocorrência de hidranencefalia implica infecção por BTV muito no início da gestação (Vercauteren *et al.*, 2008).

Os resultados dos fetos bovinos abortados bovinos examinados no estudo de De Clercq *et al.*, (2008), demonstraram de forma inequívoca que o BTV-8 é competente para atravessar a barreira placentária. Para além deste, pelo menos mais quatro serótipos BTV (BTV-10, BTV-11, BTV-13 e BTV-17) são supostamente capazes de atravessar a placenta e provocar infecção fetal (Vercauteren *et al.*, 2008).

### **3.5 - Outras Possíveis Vias de Transmissão**

A língua azul tem sido historicamente considerada uma doença não contagiosa cuja transmissão é unicamente feita pelos vectores *Culicoides*. No entanto, vários eventos ocorreram durante o surto do serótipo 8 (BTV-8) no norte da Europa, que tendem a mostrar que outras vias de transmissão são possíveis (Thiry *et al.*, 2006).

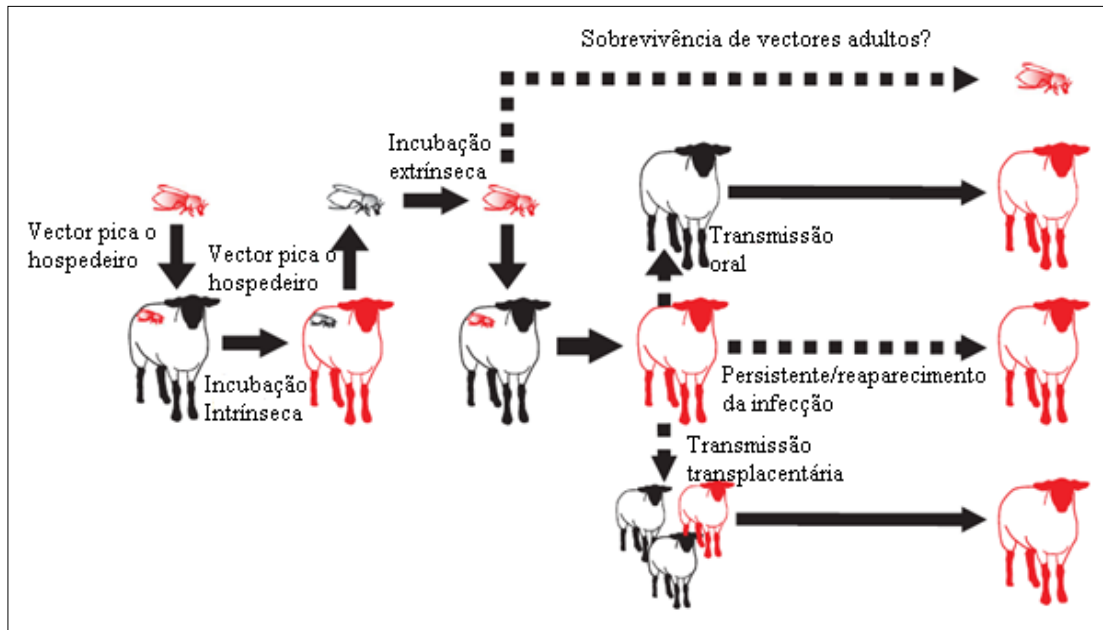
O vírus da língua azul pode ser transmitido por equipamentos cirúrgicos e agulhas. É possível também encontrá-lo no sémen, sendo a transmissão venérea por touros uma possibilidade, embora não pareça ser uma das principais vias de infecção (The Center for Food Security & Public Health, 2006).



**Figura 6:** Ciclo de possível transmissão do BTV. (Adaptado de Purse *et al.*, 2005).

O ciclo mais comum de transmissão normal do vírus da língua azul (Figura 6) foi descrito por Wilson *et al.* (2008), como sendo os vetores infectados injectarem o vírus nos hospedeiros através da saliva enquanto se alimentam do seu sangue. Os hospedeiros infectados, em seguida, passam por um período de incubação de 2 a 4 dias (Purse *et al.*, 2005) antes de desenvolverem um nível de vírus infeccioso. Os vetores que se alimentam desse hospedeiro podem ficar infectados. O vírus ingerido replica nos vetores infectados até atingir as glândulas salivares, altura em que o vector se torna infeccioso, completando-se o ciclo (Wilson *et al.*, 2008).

Outras possíveis formas de transmissão têm vindo a ser fonte de estudo (Figura 7) para além do vector e centram-se na transmissão venérea (Wrathall *et al.*, 2006), vertical (Van de Sluijs *et al.*, 2011) e horizontal (Wilson *et al.*, 2008; Backx *et al.*, 2009) da doença.



**Figura 7:** A transmissão do vírus da língua azul, mostrando possíveis rotas secundárias de transmissão. (Adaptada de Wilson *et al.*, 2009).

De acordo com Wrathall *et al.* (2006), as quantidades de vírus encontrado nas secreções dos animais infectados são muito reduzidas, não sendo geralmente a doença considerada contagiosa por via oral, ou via aerossóis. Porém, o BTV pode ser encontrado de forma esporádica no sêmen de touros virêmicos, sendo a sua presença associada, provavelmente, aos vestígios de sangue infectado com vírus que teriam saído a partir do tracto genital, e uma vez que a viremia desaparece, o vírus não volta a ser encontrado no sêmen.

Em relação à transmissão transplacentária e/ou por ingestão, o estudo publicado por Backx *et al.* (2009) demonstra que a transmissão transplacentária no final da gestação e a infecção oral do recém-nascido com o tipo selvagem BTV-8, por meio de administração de colostro de vacas não infectadas enriquecido com sangue infectado, são possíveis em bovinos, em condições experimentais.

A transmissão vertical do vírus da língua azul serótipo 8 em ovelhas foi também estudada por Van der Sluijs *et al.* (2011) que concluíram que é possível a sua ocorrência durante as diferentes fases de gestação, embora a eficácia da transmissão pareça variar para os diferentes estágios. A maior taxa de transmissão transplacentária foi encontrada a meio da gestação (69%) (70-75 dias). Esta maior taxa de transmissão pode ser explicada com base em Anderson *et al.* (1969), que apontam o maior fluxo de sangue como possível explicação para este facto.

Ainda no estudo de Van der Sluijs *et al.* (2011) foram também encontradas indicações de transmissão horizontal através de contacto directo entre ovelhas.

Para além das formas de transmissão acima descritas, também têm sido realizados estudos sobre a possibilidade de transmissão vertical do vírus entre os vectores.

Como a maioria das espécies de *Culicoides* em latitudes do norte sobrevive ao Inverno na forma de larva, pode parecer que o mais provável mecanismo para a hibernação é a transmissão vertical do vírus de vectores infectados para a descendência através do desenvolvimento dos ovos (transmissão "transovariana") (Wilson *et al.*, 2008).

No entanto, no seu estudo com larvas de *Culicoides sonorensis*, White *et al.* (2005), mostrou que o RNA do vírus da língua azul pode ser isolado de larvas, mas que o mesmo não acontece com o vírus inteiro.

### **3.6 – Medidas de controlo, segurança e prevenção da BTV**

As medidas de controlo do BTV estão centradas na protecção contra mosquitos, ou vacinação dos ruminantes. Existem medidas específicas de isolamento de animais doentes e de desinsectização dos animais, instalações e meios de transporte. Recorre-se também à estipulação

de áreas restritas situadas ao redor dos focos tendo em conta o potencial de disseminação do mosquito, por voo activo ou passivo (vento): as áreas restritas estendem-se num raio de 70 km em torno do foco do surto (FCO, 2008).

Desde 2004, as autoridades veterinárias francesas recomendam o uso de vacinas inactivadas (Aumont *et al.*, 2009).

Segundo a Direcção Geral de Saúde e Consumidores da Comissão Europeia (2010), no programa de controlo e erradicação da língua Azul para Portugal em 2011 foi implementado um conjunto de medidas, que assegurou o controlo da propagação do vírus da língua azul. Estas medidas basearam-se no acompanhamento dos planos de vigilância clínica, serológica, virologia e entomológica, na aplicação do programa de vacinação do efectivo ovino existente no território nacional continental e dos bovinos entre os 3 e os 8 meses de idade nascidos a partir de 1 de Janeiro de 2010, com destino a reprodução ou produção, bem como na aplicação de insecticidas aos animais e transportes. Concomitantemente foram aplicadas restrições à movimentação dos efectivos bovinos onde sejam detectados animais com resultados positivos aos testes de qRTi-PCR.

Em Portugal, a legislação em vigor referente à doença da língua azul (BT), consta do Edital n.º 29 de 23 de Dezembro de 2011 (Anexo X) sobre a febre catarral ovina/língua azul, da responsabilidade do Director-Geral de Veterinária, na qualidade de Autoridade Sanitária Veterinária Nacional. O referido edital entrou em vigor imediatamente após a sua publicação, revogando o Edital n.º 28 e veio solicitar a todas as autoridades veterinárias, policiais e administrativas que fiscalizem o seu integral e rigoroso cumprimento.

### **3.6.1- Vacinação**

Devido aos três requisitos de multi-serótipos, segurança e propriedades DIVA (seguras e que permitam a diferenciação entre animais vacinados e infectados), a vacinação contra o BTV (vírus da língua azul) pode ser uma questão difícil e controversa (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008).

A imunidade cruzada entre os diferentes serótipos é baixa ou nula (Aumont *et al.*, 2009).

A estimulação da imunidade pela vacinação pode reduzir efectivamente a população susceptível aos mosquitos infectados com BTV (Technical review – Bluetongue, 2002).

Dentro das vacinas contra o BTV constam as vacinas vivas atenuadas, as inactivadas e as recombinantes/nova geração.

Com o intuito de actualizar as normas em matéria de vacinação contra a língua azul previstas na Directiva 2000/75/CE, que se baseavam nas «vacinas vivas modificadas» ou «vacinas vivas atenuadas», surgiu a Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho adoptada pelo Conselho em 15 de Dezembro de 2011 (2012/C 46 E/02), a qual foi divulgada a 17 de Fevereiro de 2012 no Jornal Oficial da União Europeia (Anexo XI). Esta directiva vem tornar mais flexíveis as normas existentes, tendo em consideração o facto de estarem actualmente disponíveis vacinas inactivadas, que podem ser utilizadas com êxito fora das zonas sujeitas a restrições à movimentação de animais.

### **3.6.2 – Controlo do vector**

As medidas de luta contra os vectores da língua azul podem ser classificadas segundo Gourreau (2009), no livro *FCO* como luta ecológica, que consiste em ‘todas as acções aplicadas sobre o ambiente para tornar o meio hostil para a população de vectores’; luta biológica, ‘que

tem como princípio utilizar um ‘inimigo natural’ (predador ou patógeno) do vector alvo para diminuir as populações e assim reduzir os riscos de transmissão do agente patogénico‘ e luta química, ‘que se ocupa de empregar produtos químicos, de origem vegetal ou de síntese, na qualidade de repulsivos, atractivos, ou insecticidas’.

Pode também considerar-se a luta mecânica como uma forma de luta contra os vectores, baseando-se em ‘medidas para evitar (ou reduzir) o contacto entre o hospedeiro e vector’ (Balenghien, 2003).

Segundo a European Commission DG ENV de Março de 2011, com base no estudo de Ansari (2011), novas pesquisas sugerem que os fungos podem ser usados para controlar doenças comuns em gado transmitidas por insectos.

### **3.7 - Protocolo das lavagens sanitárias recomendadas pelo IETS**

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) classificou os agentes infecciosos em função do risco de transmissão por transferência embrionária, incluindo a língua azul na primeira categoria. Pertencem a esta categoria os agentes patogénicos para os quais o risco de transmissão de doenças pensa-se ser reduzido, desde que os embriões sejam tratados convenientemente entre a recolha e a transferência.

Para evitar a possível contaminação, todos os embriões após a recolha são lavados eficazmente, devendo ser examinados atentamente e, quando necessário, todos os vestígios de muco ou outros detritos removidos antes da lavagem (Stringfellow, 1990).

Os ovócitos e os embriões de mamíferos possuem um envoltório extracelular glicoprotéico conhecido como zona pelúcida (ZP), que tem a função de assegurar a especificidade das espécies no momento da fertilização, bloquear a poliespermia, assim como

proteger o zigoto durante os primeiros estágios do desenvolvimento. As glicoproteínas que formam a ZP são secretadas pelo ovócito em desenvolvimento, pelas células foliculares associadas ao ovócito em desenvolvimento e, em alguns casos, pelas células epiteliais que formam o oviduto (Dunbar, 1983).

Só os embriões cuja zona pelúcida está intacta e isenta de material aderente podem ser lavados eficazmente, devendo ser examinados atentamente e, quando necessário, todos os vestígios de muco ou outros detritos ser removidos antes da lavagem (Stringfellow D.A., 1990).

O objectivo do controle sanitário oficial de embriões colectados *in vivo* destinados a câmbio internacional é assegurar a ausência de patógenos específicos que podem transportar esses embriões, e evitar a contaminação das receptoras e das suas crias (OIE, 2010).

Quanto à redução de riscos através do uso de procedimentos acordados internacionalmente, o tratamento de embriões que é definido no Manual IETS consiste em (OIE, 2011):

a) Lavar os embriões pelo menos 10 vezes na diluição de pelo menos 1/100 entre cada lavagem, usando uma ponta de pipeta estéril para a transferência de embriões entre cada lavagem.

b) Lavar conjuntamente os embriões da mesma dadora, sem exceder 10 por lavagem.

c) Para a inactivação ou eliminação de alguns vírus, nomeadamente o herpesvírus-1 e o vírus da doença de Aujeszky, é necessário o procedimento de lavagem padrão ser modificado para incluir lavagens adicionais, usando por exemplo banhos com tripsina.

d) Após a lavagem, a zona pelúcida de cada embrião deve ser examinada em toda a sua área de superfície com pelo menos um aumento de 50X de forma a certificar que esta intacta e livre de qualquer material aderente.

Qualquer produto biológico de origem animal utilizado na composição dos meios e soluções utilizados na colecta, tratamento, lavagem ou armazenamento de embriões deve estar livre de microrganismos patogénicos. Meios e soluções utilizadas para a colecta e armazenamento de embriões devem ser esterilizados. Devem ser adicionados antibióticos aos meios utilizados para a colecta, manipulação, lavagem e armazenamento.

Idealmente, todo o equipamento utilizado para a colecta, manipulação, lavagem, congelamento e armazenamento de embriões deve, sempre que possível, ser novo ou, pelo menos, esterilizado antes de utilizado (OIE, 2011).

## IV – MATERIAIS E METODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados ovários recolhidos após o abate das vacas e novilhas no matadouro Sicavyl Migennes (Auxerre), independente da idade, estado do ciclo sexual ou de gestação. Os ovócitos recolhidos por punção folicular, através da ajuda de uma agulha ligada a um sistema de aspiração, constituíram um total de 1124, distribuídos por quatro sessões, os quais foram divididos em três grupos:

**Grupo I** – Grupo controlo (210 ovócitos);

**Grupo II** – Grupo experimental contaminado com o vírus BTV-17 (623 ovócitos) e BTV-8 (100 ovócitos);

**Grupo III** – Grupo experimental apenas com o meio usado para a contaminação no Grupo II (191 ovócitos), sem a presença de vírus.

Os ovócitos pertencentes ao Grupo I não sofreram qualquer tipo de contaminação, sendo após a classificação, tendo em conta critérios morfológicos, sido colocados directamente em maturação.

Os ovócitos pertencentes ao Grupo II foram divididos em quatro grupos:

**Grupo II a)** - (207 ovócitos), no qual os ovócitos foram contaminados com BTV-17 na concentração de  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL;

**Grupo II b)** - (207 ovócitos), no qual os ovócitos foram contaminados com BTV-17 na concentração de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL

**Grupo II c)** - (209 ovócitos), no qual os ovócitos foram contaminados com BTV-17 na concentração de  $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL

**Grupo II d)** - (100 ovócitos), no qual os ovócitos foram contaminados com BTV-8 na concentração de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL

Aos ovócitos pertencentes ao Grupo III (191 ovócitos) foi-lhes adicionado o mesmo meio *Minimum Essential Medium* (MEM), que serviu para a diluição do vírus.

Antes de qualquer tratamento, foram retirados um total de 90 ovócitos, os quais foram usados para confirmar que nenhum dos animais estaria contaminado com o BTV.

Os vírus BTV utilizados na contaminação experimental do presente trabalho tanto o serótipo 17 (*MI-VIRO-03*) como o serótipo 8, foram isolados a partir de amostras de sangue de bovinos que apresentaram sinais clínicos de língua azul e que se encontravam positivos para a PCR (qRTi-PCR) para cada um dos serótipos. Esta preparação foi efectuada no INRA da seguinte forma:

Primeiramente foram inoculados ovos de galinha, embrionados com uma preparação de células vermelhas do sangue. Após um período de incubação de dois a sete dias, os ovos inoculados foram abertos e os embriões que mostravam aparência hemorrágica foram esmagados em meio contendo antibióticos. O homogenato obtido foi então inoculado em células BHK-21 e estas cultivadas por vinte e quatro horas. O BTV-17 e BTV-8 foram separadamente postos em suspensão em MEM, de forma a poderem ser utilizados no presente trabalho.

O material foi manipulado e analisado no laboratório de Fertilização *in vitro* (FIV) da UNCEIA localizado em Maisons-Alfort, Paris.

## 4.1 - Produção de embriões *in vitro*:

A produção de embriões *in vitro* (PIV) envolveu três fases: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e desenvolvimento *in vitro* (DIV) que permitiu obter, a partir de ovócitos imaturos, embriões no estado de mórula ou blastócito, transferíveis para receptoras.

### 4.1.1 -Recolha e Maturação de ovócitos *in vitro*

Os ovários foram colectados no matadouro de Sicavyl de Migennes (Auxerre), sob supervisão veterinária, e enviados para o laboratório em solução salina (Euro-Flush) contendo antibióticos (sulfato de kanamicina 50 mg/L), a uma temperatura de 28 C °.

O conteúdo dos folículos de diâmetro entre 2 a 6 mm foi então aspirado em câmara de fluxo laminar, para um tubo de 50 mL com 1 mL de meio de colecta, por uma agulha ligada a um sistema de aspiração.

Após um período de repouso de alguns minutos que permitiu a sedimentação dos ovócitos, procedeu-se à diluição do sedimento, constituído por células da granulosa e ovócitos rodeados por células do *cumulus*, numa placa de *petri* com meio de colecta (Meio 199 tamponado em hepes (Gibco) com Nistatina, gentamicina e soro fetal de bezerro (SVF)).

Os complexos *cumulus-ovócitos* (COC) foram classificados com base no seu aspecto morfológico em A, B, C e D de acordo com a classificação de Wurth *et al.* em que:

- COC A - ovócito com *cumulus* brilhante e expandido;
- COC B - ovócito com *cumulus* expandido, mas com menos células e mais escuras que o anterior;

- COC C - ovócito com *cumulus* exageradamente expandido com células degeneradas, formando aglomerados mais escuros;

- COC D - ovócito desnudado, com a zona pelúcida exposta.

Apenas foram seleccionados para a maturação os COCs que evidenciavam um citoplasma uniformemente granuloso, rodeados de 3 a 4 camadas compactas de células do *cumulus*, não expandidas (COCs A, B e C), os quais foram submetidos a duas lavagens sucessivas num meio de colecta e a uma em meio de maturação (Meio 199 HEPES (Gibco 22340-012) suplementado com soro fetal de bezerro (FCS), antibiótico, gentamicina, factor de hormonas hipofisárias LH/FSH, hormona esteroide (Estradiol 17 $\beta$ ) e factor de crescimento (EGF). A maturação dos ovócitos teve lugar numa placa de 4 poços (Nunc) estéril cada uma com 500 $\mu$ L de meio de maturação, (com água destilada estéril no espaço entre os 4 poços).

Os COCs foram divididos em grupos de 50 para cada um dos poços das placas e incubados por 22-24 horas em estufa a 38,5°C e com 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

#### **4.1.2 - Capacitação in vitro de sémen de bovino**

Foram utilizadas palhinhas de sémen congelado em azoto líquido a -196°C sempre do mesmo touro. A descongelação da palhinha de sémen foi realizada pondo a mesma em banho-maria de 37,5°C por 40 segundos, limpando-se em seguida esterilmente a água sobre a palhinha, o sémen foi colocado sobre um gradiente de *BoviPure*<sup>TM</sup> e centrifugou-se durante 20 minutos a 500g à temperatura ambiente. Posteriormente, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur tirou-se o sobrenadante deixando um mínimo de meio e pôs-se novamente em suspensão.

De forma a proceder à contagem de espermatozóides, retiraram-se 5 $\mu$ L da suspensão de spz e adicionaram-se 95 $\mu$ L de água destilada (diluição 1/20) para contagem numa Câmara de

Neubauer. A quantidade de sémen a colocar em cada poço da placa de FIV foi calculada de acordo com o número de espermatozóides obtidos na contagem, de forma a obter a concentração final de 1 milhão/mL.

#### **4.1.3 - Fertilização in vitro**

Após 22 a 24 horas de maturação in vitro (MIV), os COCs foram lavados em meio de fertilização à base de TALP (*Tyrode's albumin lactate pyruvate*) com BSA (*bovine serum albumin*) e PHE (*penicillamine, hypotaurine e epinephrine*), que estimula a motilidade dos espermatozóides (SPZ).

Para a fertilização apenas se usaram os complexos *cumulus-ovócito* (COCs) que apresentaram um ooplasma uniforme ou regular, evidenciando um grau elevado de expansão das células do *cumulus*.

A fertilização dos ovócitos teve então lugar em placas de fertilização *in vitro* (FIV), com quatro poços contendo meio de fertilização e uma gota de água destilada estéril no espaço entre os respectivos 4 poços da placa de FIV (*Plaque multidish 4 puits*, Nunc), as quais foram previamente equilibradas na estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> no ar, durante pelo menos duas horas.

A co-incubação com os ovócitos realizou-se por 18 horas numa estufa a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

#### 4.1.4 - Cultura de embriões in vitro

Findo o período de incubação os presumíveis zigotos foram mecanicamente desnudados por movimentos repetidos de pipetagem em vai e vem e lavados em meio de cultura mSOF, (*Synthetic Oviduct fluid* modificado) com BSA (*bovine serum albumin*), Nistatina e Gentamicina. Posteriormente à lavagem com meio de cultura, colocaram-se em microgotas (50 por microgota) em placas de quatro poços (*Plaque multidish 4 puits*, Nunc) cobertas por 450µL de óleo mineral (Sigma-M4810). Os zigotos foram assim incubados até ao sétimo dia numa estufa incubadora a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

#### 4.1.5 – Clivagem

No quarto dia após a punção dos ovários, realizou-se a clivagem dos supostos zigotos, pelo que se colocaram 500µL de NaCl 0,9% estéril por poço de uma Placa de Nunc (*Plaque multidish 4 puits*, Nunc) e seleccionaram-se os não clivados, os quais foram colocados em NaCl e posteriormente retirados com uma quantidade mínima de NaCl e postos noutra poço da Placa de Nunc com cerca de 500µL de fixador. A placa foi selada com fita-adesiva e colocada no frigorífico, tendo os resultados sido lidos no dia seguinte e classificados os supostos zigotos não clivados como: imaturos, parcialmente maduros, maduros, partogenéticos, fecundados e polispérmicos, a decorrer a 1<sup>o</sup> divisão ou ininterpretáveis a leitura.

Assim, pode dizer-se que:

- Número de ovos penetrados = número de ovos segmentados + número de ovos fecundados + ovos polispérmicos;

- Percentagem de ovos penetrados = número de ovos penetrados ÷ número de ovócitos inseminados \* 100;
- Percentagem de ovos segmentados = número de ovos segmentados ÷ número de ovos penetrados \* 100.

## **4.2 - Contaminação experimental com o serótipo BTV-17:**

No presente estudo fizeram-se três manipulações de inoculação com o serótipo 17 do vírus da língua azul (BTV-17) e uma inoculação com o vírus BTV-8. Realizadas antes da fase de maturação *in vitro*, as inoculações fizeram-se nas concentrações de  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL,  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL e  $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL, para o BTV-17 e  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL para o BTV-8 em meio *Minimal Essencial Medium* (MEM), durante 1 hora a 37 C° numa estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

Depois de 1 hora, os ovócitos foram submetidos a duas lavagens em meio de colecta e uma em meio de maturação, sendo em seguida, colocados em cultura por 22 horas a 38,5°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

## **4.3 - Procedimento de lavagens sanitárias recomendado pelo IETS**

Efectuaram-se dez lavagens no sétimo dia após os embriões terem sido postos em cultura.

As lavagens a que os embriões de bovino produzidos *in vitro* e experimentalmente infectados pelo vírus da língua azul (BTV) foram sujeitos, basearam-se nas estipuladas pelo protocolo padrão do IETS sem recurso à tripsina.

Procedeu-se à pipetagem, com o auxílio de uma macropipeta electrónica, de 2mL de solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS) taponada e 0,4% de *bovine serum albumin* (BSA) para grupos de dez placas de *Petri* descartáveis 60x15mm (estéreis e sem divisão).

Os embriões foram passados sucessivamente pelas lavagens, sendo mudada a ponta da pipeta entra cada lavagem e fazendo-se a transferência dos embriões de uma lavagem para a seguinte, de uma só vez.

#### **4.3. 1 - Recolha e armazenamento de amostras de sanitárias**

Uma amostra de ovócitos e fluido folicular obtidos por aspiração folicular de lotes de ovários recuperados no matadouro foi usada para certificar a ausência à partida de agentes patogénicos na população de ovócitos.

Para além destas amostras e, para fins de controlo de qualidade, recolheram-se e analisaram-se seguintes amostras na quantidade de 1mL:

- Ambiente de contaminação;
- Meio de colecta (2 lavagens);
- Meio de maturação (Meio 199 Hepes (Gibco 22340-012)) antes (1 lavagem) e após 22 horas incubação;
- Meio de fertilização *in vitro* (TALP) antes (2 lavagens) e depois de 18 horas de fertilização;
- Células do *cumulus* e 10 embriões após a fertilização;
- Meio de cultura (SOF) antes (2 lavagem) e depois de 7 dias de cultura;

- Três primeiras e três últimas lavagens sanitárias das séries de dez lavagens efectuadas para cada série de 10 embriões;

- Os embriões lavados.

As amostras foram colectadas logo após as manipulações para microtubos de 1.5mL (1.5ml Micro Centrifuge Tube) e congeladas a -20°C antes de serem analisadas por qRTi-PCR para detectar a presença de genoma viral e avaliar a eficácia das lavagens sanitárias postas em prática.

#### **4.4 - Detecção do genoma viral**

As técnicas moleculares (qRTi-PCR) têm sido desenvolvidas nos últimos anos, servindo para amplificar o *ribonucleic acid* (RNA) viral genómico a partir de amostras clínicas (incluindo o sangue).

O genoma do vírus da língua azul é composto por 10 segmentos de RNA de cadeia dupla e de diferentes tamanhos. Alguns destes segmentos são comuns aos diferentes serótipos virais, enquanto outros variam de acordo com o vírus.

Recorreu-se ao sequenciamento de segmentos de RNA que compõem o genoma viral para seleccionar os *primers* utilizados nos ensaios subsequentes de *polymerase chain reaction* (PCR).

Os primers derivados de segmentos conservados, tais como aqueles que codificam as proteínas do capsídeo viral VP3 (segmento 3), VP6 (segmento 6), VP7 (segmento 7) ou proteínas não estruturais NS1, podem ser usados para fazer um grupo de diagnóstico, ou seja, a detecção do genoma da língua azul vírus e/ou EHD (doença hemorrágica epizoótica dos veados).

Os primers derivados de segmentos variáveis, como os que codificam a superfície externa das proteínas VP2 (segmento 2) ou da proteína não-estrutural NS3 (segmento 10), forneceram

informações sobre o serótipo, usado para o desenvolvimento de testes de tipificação diferencial (Zientara S. *et al.*, 2002).

A qRTi-PCR é uma técnica que combina a transcrição inversa do RNA (RT, transcriptase reversa) a uma amplificação génica (PCR, reacção em cadeia *polymersae*).

O cDNA (*Complementary Deoxyribonucleic acid*) foi sintetizado por uma DNA polimerase dependente de RNA (a transcriptase inversa) e amplificado por qRTi-PCR (ou *quantitative real-time PCR*). A PCR pode servir como quantitativo para medição da carga viral através da medição do número de *amplicons* (porção de DNA definida por um par de primers) produzidos durante a reacção, sendo essa quantidade proporcional ao número de cópias presentes no tubo no começo da reacção (Viville, J-S., 2010).

Na realização deste trabalho utilizou-se o *Kit TaqVet® Bluetongue Virus All Genotypes*.

#### **4.4.1 - Extracção e purificação de RNA viral**

A extracção do RNA foi feita em coluna, recorrendo ao kit *QIAGEN QIAamp viral RNA mini kit* (ref : 52904 ou 52906).

De acordo com o protocolo fornecido pelo protocolo da LSI (*Laboratoire service international*, 2011) para o *Kit TaqVet® BTVM – All genotype*, da extracção do RNA constam a extracção do NCS (controlo negativo), preparação do tampão RNA-AVE e do tampão lise (TL).

A extracção do NCS consistiu em extrair 100µL de água livre de RNase.

Para a preparação do tampão RNA-AVE adicionaram-se 310µL de tampão AVE fornecido com o kit de extracção num tubo de RNA transportador (5 tubos por kit para 250 reacções) e passou-se brevemente pelo vórtex e pela centrífuga.

O tampão de RNA-AVE pode ser armazenado a -20°C entre cada série de extracção, mas não deve ser descongelado mais do que 3 vezes.

No caso do TL, no momento da extracção, o tampão fornecido pelo kit de extracção AVL foi aquecido antes de utilizado (5 minutos a 80°C) de forma a garantir a sua homogeneização (ausência de cristais).

A quantidade de tampão a preparar para as amostras (N) existentes foi calculada pela fórmula  $(N + 3) \times 560\mu\text{l}$  para o tampão AVL e  $(N + 3) * 5,6\mu\text{L}$  para a quantidade de tampão RNA – AVE a adicionar.

Preparou-se tampão lise (TL) para 1.5mL de tampão AVL (*Viral lysis*) e 100μL da amostra e efectuou-se uma centrifugação rápida. Ao adicionar ao tubo uma quantidade de 560μL de etanol 100% centrifugou-se para obter a lise da amostra.

Fez-se uma lavagem com a ajuda de 500μL dos tampões de lavagem AW1 e AW2 (reconstituídos), sucessivamente, para eliminar o álcool. Seguiu-se uma secagem da membrana de sílica por centrifugação durante 3 minutos a 10000g.

A recuperação do extracto de RNA foi realizada após a distribuição de 40μL de *Buffer* AVE do *Kit QIAamp Viral* dentro dos microtubos de 1,5μL, com uma centrifugação de cerca 2 minutos a 6000g e armazenamento de microtubos em gelo a 4°C.

#### **4.4.2 – A desnaturação e amplificação de RNA Viral: desnaturação e amplificação**

A desnaturação e amplificação da dupla-hélice do RNA viral do vírus da língua azul (BTV) foram feitas através de um aparelho de *quantitative real-time PCR*.

Recorreu-se a um termociclador (*Abi-Prism 7500 fast Time PCR-System*), de alta tecnologia fornecido pelo *Applied Biosystems* e validado pelo LSI, acoplado a um espectrofluorímetro (sistema óptico de detecção das sondas que não fluorescem após a sua fixação ao DNA gerado nas reacções de *quantitative real-time PCR*).

Uma vez que a quantidade de DNA permite às sondas fluorescentes excederem o limite, temos um número de ciclos de PCR denominado Ct (*Cycle Threshold* ou ciclo limite). O Ct é o número de ciclos de replicação necessários antes dos fragmentos do genoma amplificados atingirem o limite de onde pode ser detectado (Germanique L.A., 2010). O valor de Ct é a base dos cálculos para quantificar o DNA em termos absolutos ou relativos.

A desnaturação foi feita para todas as amostras, incluindo controlos negativos de extracção e controlos positivos de qRTi-PCR. Para a desnaturação do RNA colocaram-se 20µL de amostra (RNA viral) em cada poço de uma placa de 96 poços. Vedaram-se os poços e fez-se uma centrifugação rápida à placa. Aqueceu-se por 3 minutos a 95°C no termociclador. Em seguida, centrifugou-se novamente (alguns minutos a 2500g a 4°C) e colocou-se a placa no gelo picado (4°C) até ao seu uso.

O RNA desnaturado foi armazenado a 4°C, visto que a amplificação foi realizada imediatamente a seguir à desnaturação.

A amplificação, hibridação e o alongamento, foram conduzidos ao mesmo tempo após a programação do termociclador depois de se porem 5µL de RNA viral desnaturado em cada placa de 96 poços contendo 20µL de Mix BTV (pronto a usar). A placa foi coberta por uma película adesiva transparente adaptada e começou-se a amplificação de acordo com as indicações presentes no seguinte quadro (Quadro 1):

**Quadro 1:** Etapas do programa de amplificação de qRTi-PCR.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura e duração</b>	<b>Características</b>	<b>N.º de ciclos</b>
<u>Etapa 1</u>	45°C - 10 minutos	- etapa de qRTi-PCR - produção de DNA complementar a partir de RNA viral desnaturado	1
<u>Etapa 2</u>	95°C - 10 minutos	- etapa de desnaturação das dupla hélices de DNA complementares e de activação da Taq Polimerase	1
<u>Etapa 3</u>	95°C - 15 segundos (desnaturaç�o) 60°C - 45 segundos (elongaç�o)	- etapa de hibrida�o fixa�o dos primers e elonga�o (a leitura de fluoresc�ncia � efectuada durante a fase de elonga�o)	40

#### **4.4.3 - Interpreta o dos resultados da qRTi-PCR**

A reac o de polimeriza o em cadeia (PCR) tem sido uma ferramenta essencial em biologia molecular e a sua aplica o na detec o dos  cidos nucle cos revolucionou a an lise quantitativa dos genes e dos seus mensageiros. Este conceito tecnol gico evoluiu rapidamente no decorrer dos  ltimos anos, e o n mero crescente das aplica es quantitativas da PCR contribuiu para o desenvolvimento da *quantitative real-time* PCR (qRTi-PCR) (Tse C. *et al.*, 2005).

Na Europa o qRTi-PCR   o m todo de refer ncia para a identifica o do genoma do BTV.   mais r pido do que o PCR convencional, permite a redu o da contamina o e a automatiza o das manobras (Germanique L.A., 2010).

Segundo o quadro abaixo, adaptada do protocolo da LSI (*Laboratoire service international*, 2011),   poss vel classificar os resultados como positivos, inconclusivos, negativos e n o v lidos.

**Quadro 2:** Interpretação dos resultados de qRTi-PCR (Adaptado de LSI, 2011).

	Ct Mix BTVM	
Interpretação	“Detector” BTVM / $\lambda=530\text{nM}$	“Detector” IPC / $\lambda=560\text{nM}$
Positivo	$\text{Ct} < 34$	$\text{Ct} < 30$
Inconclusivo	$40 \geq \text{Ct} \geq 34$	$\text{Ct} < 30$
Negativo	$\text{Ct} > 40$	$\text{Ct} < 30$
Não válido	$\text{Ct} > 40$	$\text{Ct} \geq 30$

Neste trabalho analisaram-se amostras de meios e de material genético, tendo-se classificado as amostras exactamente de acordo com o Quadro 2.

No caso de Ct ser maior que 34 e menor de 40 (resultado inconclusivo), significa que no caso da amostra ser referente a um animal cujo estado clínico se pretende determinar, tal não pode ser definido, pois a infecção pode ser muito recente (início viremia) ou muito antiga (há detecção do genoma do BTV até 200 dias após a infecção), sendo que neste último caso, o vírus já não é infeccioso.

No capítulo dos resultados, todos os valores considerados tiveram menos que três desvios padrões e todos os controlos internos (IPC) deram todos valores de Ct inferiores a 30 (19-23).

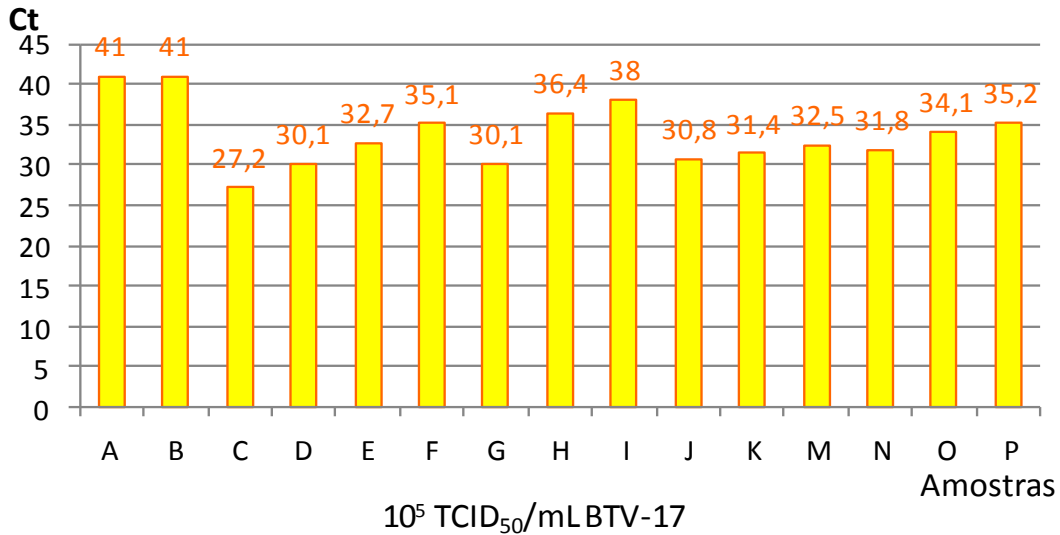
#### **4.5- Análise estatística**

Para determinar se as lavagens foram ou não eficientes para a descontaminação do vírus nos embriões ao fim de 7 dias em cultura, foram realizadas análises estatísticas dos resultados em Ct (qRTi-PCR) para os diferentes líquidos de lavagens e dos próprios embriões. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) associada aos testes de *Tukey HSD* e ao teste da menor diferença significativa (LSD). Para testar a homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transferência de embriões, realizada com sucesso pela primeira vez por Walter Heape em 1890, começou como uma ferramenta de investigação científica, tendo a primeira empresa comercial de transferência de embriões em bovinos sido criada no início de 1970 (Betteridge, 2003). Actualmente, a produção *in vitro* de embriões de mamíferos domésticos de interesse económico, por meio das técnicas de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, apresenta-se como uma importante biotécnica de reprodução, a qual está associada ao aumento da produtividade na produção animal, independentemente das espécies exploradas. Tratando-se de uma técnica a nível comercial, a qual envolve circulação de material genético, entre diferentes países, o controlo sanitário oficial dos embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* destinados a serem implantados em animais vivos, tem que garantir que organismos patogénicos que eventualmente possam estar associados aos embriões, sejam controlados e a transmissão de infecções aos animais destinatários e prole seja evitada (OIE, 2011).

Nas Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 são apresentados os resultados obtidos das corridas em qRTi-PCR para as diferentes inoculações e diferentes concentrações do vírus BTV-17 e BTV-8.



- |                                 |   |   |
|---------------------------------|---|---|
| <b>A-</b> Fluido folicular;     | <b>F-</b> Meio de maturação;                  | <b>K-</b> Meio de FIV após 18h;         |
| <b>B-</b> Amostras de oócitos;  | <b>G-</b> Meio de maturação após 22h;         | <b>M-</b> 10 zigotos após a FIV;        |
| <b>C-</b> Meio de contaminação; | <b>H-</b> Meio de FIV 1;                      | <b>N-</b> Meio de SOF 1;                |
| <b>D-</b> Meio de colecta n.º1; | <b>I-</b> Meio de FIV 2;                      | <b>O-</b> Meio de SOF 2;                |
| <b>E-</b> Meio de colecta n.º2; | <b>J-</b> Células do <i>cumulus</i> após FIV; | <b>P-</b> Meio de cultura (após 7 dias) |

**Figura 8:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus para  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTBV-17.

Como pode ser observado nas figuras 8, 9, 10 e 11 nas duas primeiras etapas, referentes ao fluido folicular (A) e às amostras de ovócitos puncionados (B), não foi identificada a presença do vírus BTV 7 (Ct = 41). As amostras onde se observou o máximo da detecção do vírus foram as referentes ao momento da contaminação (C) com os valores de Cts de 27,2; 24,7; 16,2 e 22, respectivamente, para as concentrações de  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTBV-17;  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTBV-17;  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-8 e  $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17. Como resultado das lavagens, pode constatar-se que, aquando das 2 lavagens em meio de colecta (D e E), de maturação (F) e,

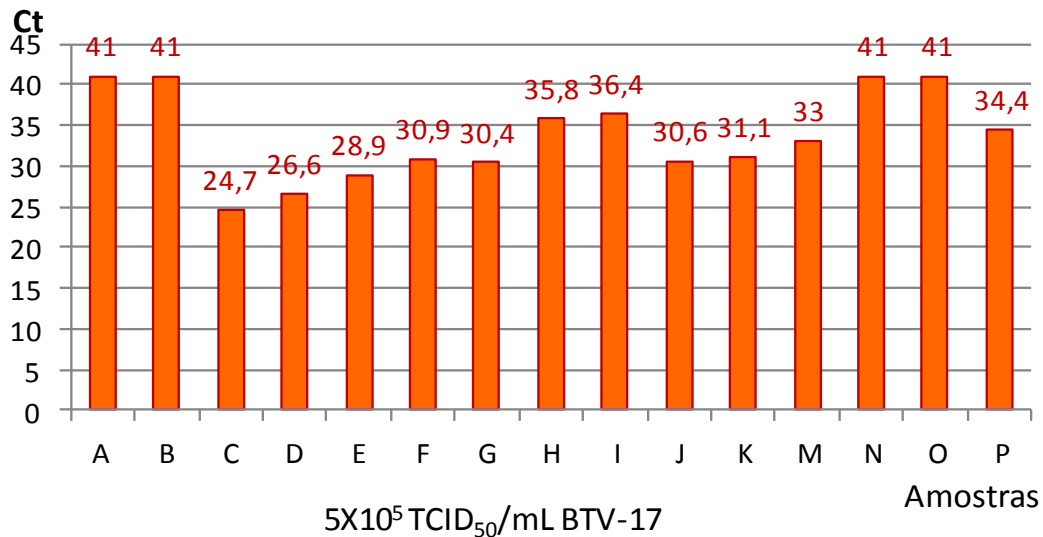
as duas em meio de FIV (H e I) os valores de Ct aumentam, logo podemos dizer que a concentração de vírus diminuiu.

Em relação ao meio de maturação e FIV, respectivamente 22-24 horas de maturação (F), e 18h de FIV (K), verificaram-se valores de Ct menores, o que significa um aumento de partículas virais na amostra.

Nota-se também valores mais baixos de Ct no que refere às células do *cumulus* (J), o que é de esperar já que se pensa que é a elas que o vírus se fixa. O meio de FIV (K) regista no entanto valores muito semelhantes aos das células do *cumulus*.

Os zigotos após a FIV (M) encontraram-se positivos para a presença do vírus (Ct = 32,5, Figura 8).

Após 7 dias de cultivo (P), a presença do vírus no meio ainda foi positiva, apesar das lavagens efectuadas com SOF (N e O) e de se terem removido as células do *cumulus* (J).



- |                                 |   |   |
|---------------------------------|---|---|
| <b>A-</b> Fluido folicular;     | <b>F-</b> Meio de maturação;                  | <b>K-</b> Meio de FIV após 18h;         |
| <b>B-</b> Amostras de oócitos;  | <b>G-</b> Meio de maturação após 22h;         | <b>M-</b> 10 zigotos após a FIV;        |
| <b>C-</b> Meio de contaminação; | <b>H-</b> Meio de FIV 1;                      | <b>N-</b> Meio de SOF 1;                |
| <b>D-</b> Meio de colecta n.º1; | <b>I-</b> Meio de FIV 2;                      | <b>O-</b> Meio de SOF 2;                |
| <b>E-</b> Meio de colecta n.º2; | <b>J-</b> Células do <i>cumulus</i> após FIV; | <b>P-</b> Meio de cultura (após 7 dias) |

**Figura 9:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17.

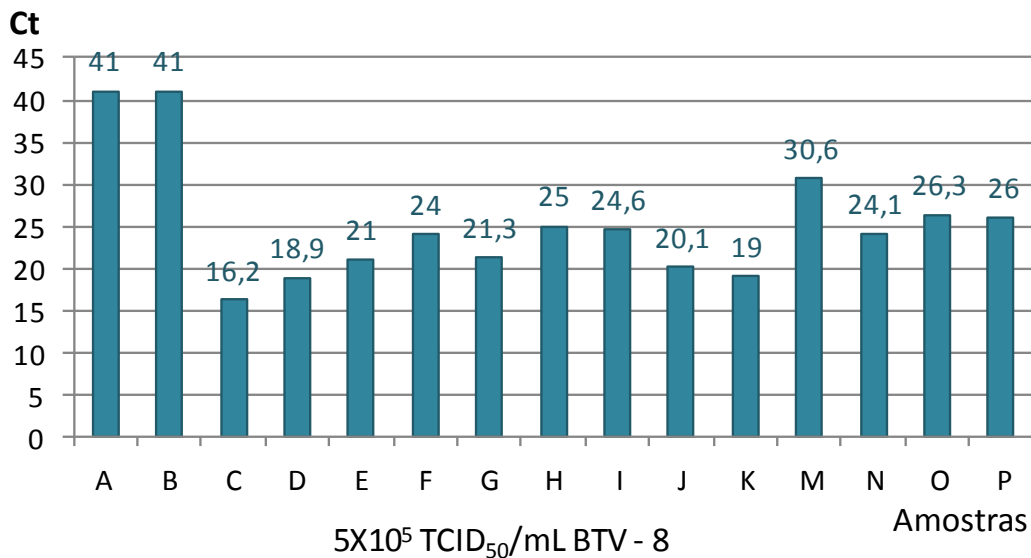
Pela Figura 9, onde são apresentados os resultados de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17, pode observar-se que aquando das 2 lavagens em meio de colecta (D e E), de maturação (F) e, as duas em meio de FIV (H e I) os valores de Ct aumentaram, logo podemos dizer que a concentração de vírus diminuiu ligeiramente, passando os resultados, no caso do meio de FIV (H e I) para inconclusivos.

Como é possível constatar na Figura 9, em relação ao meio de maturação, tanto o período de 22 - 24 horas de maturação (G), como no de 18h de FIV (K) testados, verificaram-se valores de Ct menores, o que significa um aumento de partículas virais na amostra.

Notam-se também valores mais baixos de Ct no que refere às células do *cumulus* (J). O meio de FIV (K) registou, no entanto, valores muito semelhantes aos das células do *cumulus*.

Os zigotos após a FIV (M) encontraram-se positivos quanto à presença do vírus (Ct = 33, Figura 9).

Após 7 dias de cultivo (P), a presença do vírus ainda foi positiva, apesar das lavagens efectuadas com SOF (N e O), nas quais não se verificou a presença do vírus no meio, e de terem sido removidas as células do *cumulus* (J).



- |                                 |   |   |
|---------------------------------|---|---|
| <b>A-</b> Fluido folicular;     | <b>F-</b> Meio de maturação;                  | <b>K-</b> Meio de FIV após 18h;         |
| <b>B-</b> Amostras de oócitos;  | <b>G-</b> Meio de maturação após 22h;         | <b>M-</b> 10 zigotos após a FIV;        |
| <b>C-</b> Meio de contaminação; | <b>H-</b> Meio de FIV 1;                      | <b>N-</b> Meio de SOF 1;                |
| <b>D-</b> Meio de colecta n.º1; | <b>I-</b> Meio de FIV 2;                      | <b>O-</b> Meio de SOF 2;                |
| <b>E-</b> Meio de colecta n.º2; | <b>J-</b> Células do <i>cumulus</i> após FIV; | <b>P-</b> Meio de cultura (após 7 dias) |

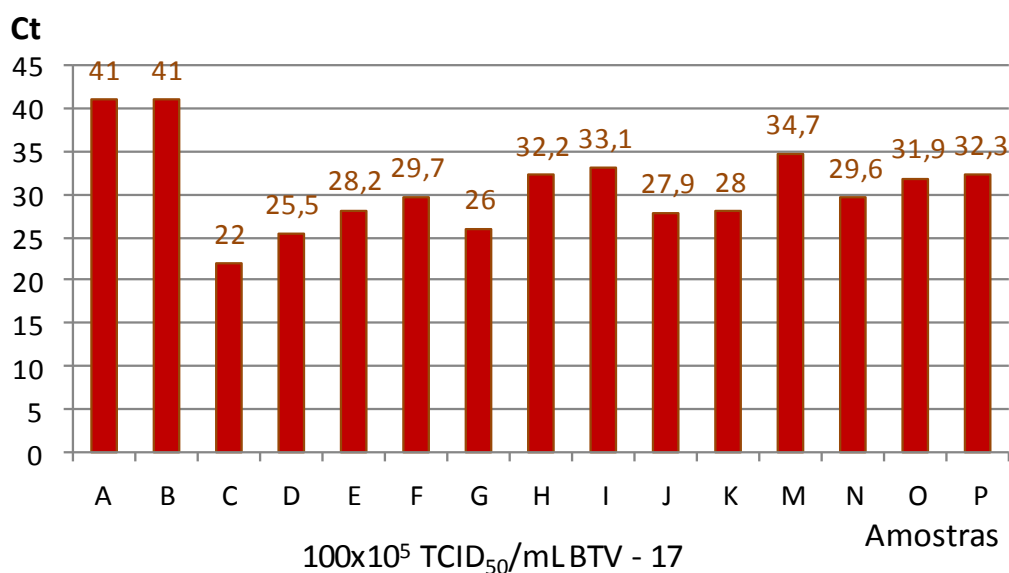
**Figura 10:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus para  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTv-8.

Para a concentração de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-8, observou-se que nas duas lavagens em meio de colecta (D e E), de maturação (F) e a primeira em meio de FIV (H) (Figura 10), que os valores de Ct aumentaram, logo podemos dizer que a concentração de vírus diminuiu ligeiramente. No caso da amostra correspondente ao segundo meio de lavagem FIV, observou-se uma ligeira diminuição de 25 para 24,6 Cts.

Como é possível voltar a constatar, em relação ao meio de maturação, tanto o período de 22 - 24 horas de maturação (G), como no de 18h de FIV (K) testados, observaram-se valores de Ct menores, o que significa um aumento de partículas virais nas amostras.

Como nas figuras anteriores, também se notam valores mais baixos de Ct no que refere às células do *cumulus* (J). O meio de FIV (K) registou no entanto valores muito semelhantes aos das células do *cumulus*. Os zigotos após a FIV (M) encontram-se positivos quanto à presença do vírus (Ct = 30,6, Figura 10).

Mais uma vez, e como observado para o serótipo 17 do vírus, após 7 dias de cultivo (P), a presença do vírus no meio ainda é positiva, apesar das lavagens efectuadas com SOF (N e O), nas quais não se verificou a presença do vírus, e de terem sido removidas as células do *cumulus* (J).



- |                                 |   |   |
|---------------------------------|---|---|
| <b>A-</b> Fluido folicular;     | <b>F-</b> Meio de maturação;                  | <b>K-</b> Meio de FIV após 18h;         |
| <b>B-</b> Amostras de oócitos;  | <b>G-</b> Meio de maturação após 22h;         | <b>M-</b> 10 zigotos após a FIV;        |
| <b>C-</b> Meio de contaminação; | <b>H-</b> Meio de FIV 1;                      | <b>N-</b> Meio de SOF 1;                |
| <b>D-</b> Meio de colecta n.º1; | <b>I-</b> Meio de FIV 2;                      | <b>O-</b> Meio de SOF 2;                |
| <b>E-</b> Meio de colecta n.º2; | <b>J-</b> Células do <i>cumulus</i> após FIV; | <b>P-</b> Meio de cultura (após 7 dias) |

**Figura 11:** Resultados em Ct da qRTi-PCR da presença ou ausência de vírus para  $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17.

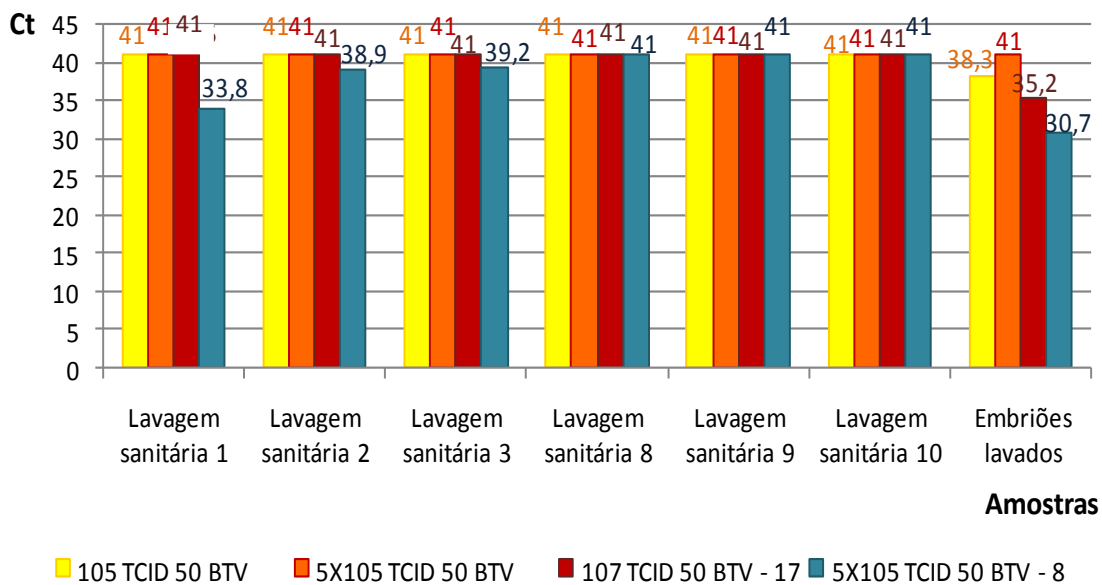
Na Figura 11, aquando das duas lavagens em meio de colecta (D e E), de maturação (F) e, as duas em meio de FIV (H e I) observa-se que os valores de Ct aumentam, logo podemos dizer que a concentração de vírus diminui ligeiramente, passando os resultados, no caso meio de FIV (H e I) para inconclusivos.

É possível constatar novamente, em relação ao meio de maturação, tanto o período de 22 - 24 horas de maturação (G), como no de 18h de FIV (K) testados, valores de Ct menores, o que significa um aumento de partículas vírus na amostra.

Notam-se também, mais uma vez, que os valores mais baixos de Ct no que refere às células do *cumulus* (J), o que é de esperar já que se pensa que é a elas que o vírus se fixa. O meio de FIV (K) regista no entanto valores muito semelhantes aos das células do *cumulus*.

Os zigotos após a FIV (M) encontram-se inconclusivos quanto à presença do vírus (Ct = 34,7, Figura 11).

Após 7 dias de cultivo (P), tal como nas 3 figuras anteriores, a presença do vírus no meio ainda é positiva, apesar das lavagens efectuadas com SOF (N e O), nas quais não se verificou a presença do vírus, e de terem sido removidas as células do *cumulus* (J).



**Figura 12:** Resultados em Ct da qRTi-PCR, da presença ou ausência de vírus BTV de acordo com as diferentes concentrações de BTV, no líquido de lavagem, nas três primeiras e três últimas lavagens sanitárias e nos embriões após os procedimentos de lavagem sanitários recomendados pela IETS.

De acordo com a Figura 12 pode ver-se que os meios das lavagens sanitárias apresentaram-se negativos para o BTV, à excepção do 5X10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL BTV-8, em que a

primeira lavagem se apresenta, positiva enquanto que as duas seguintes se apresentam inconclusivas.

Após as dez lavagens sanitárias os embriões contaminados com  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-8, apresentaram resultado positivo para a presença do vírus, tendo sido inclusivos para a concentração de  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17 e  $100 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17 e negativos para  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL BTV-17 (Figura 12).

Alguns estudos dentro desta área já têm vindo a ser desenvolvidos, nomeadamente para outros serótipos. Thomas *et al.*, (1985) verificou no seu estudo, que é possível obter facilmente bezerros livres de BTV a partir do uso de sémen positivo para BTV.

No *EFSA Journal 2011* no artigo referente à opinião científica sobre o BTV-8 (Vannier *et al.*, 2011) é feita uma revisão da literatura existente, pelo que é possível afirmar que actualmente, três características especiais podem ser atribuídas a BTV-8: a capacidade de causar doença grave em bovinos e caprinos, a capacidade de ser transmitidos transplacentariamente e a capacidade para contaminar sémen. Mais pesquisas são necessárias para determinar se a transmissão oral e/ou se a transmissão através de transferência de embriões é mais propensa a ocorrer por BTV-8 do que para outros serótipos BTV.

Um estudo *in vitro* de Al Ahmad *et al.* (2011) mostrou que o procedimento de lavagem IETS não conseguiu remover completamente o BTV-8 da zona pelúcida intacta de embriões caprinos. Sendo que, actualmente, não se sabe se este facto é específico para o BTV-8, ou se também se aplica a outros serótipos de BTV, daí neste estudo se ter realizado a contaminação com BTV-8, como elemento de comparação. Porém, segundo o artigo, em geral, os animais receptores não mostraram evidência de infecção depois de receber os embriões de dadoras

infectadas, à excepção de um estudo com BTV-11 em que as novilhas beneficiárias apresentaram soroconversão.

Foi também demonstrado que o tratamento, com tripsina, de embriões produzidos *in vivo*, em que a zona pelúcida está intacta, é eficaz na remoção ou inactivação de vírus que parecem unir-se ou aderir à zona pelúcida após exposição *in vitro* (Stringfellow, 1990). Tal facto leva a pensar que também seria de interesse futuramente desenvolver um estudo com vista a compreender a interacção do serótipo 17 do vírus da língua azul (BTV-17) no ovócito, nomeadamente onde se fixa e se penetra a zona pelúcida mesmo que esta se encontre intacta.

No total, 234 embriões foram produzidos no grupo controlo, no contaminado com BTV-17 e no grupo em que os ovócitos foram cultivados em MEM. Para o grupo em que os ovócitos foram contaminados com BTV-8, um total de 20 embriões foi produzido.

A análise estatística dos dados do desenvolvimento dos embriões até o dia sete não foi estatisticamente significativa para os diferentes tratamentos (Quadro 3). Isso significa que o vírus da língua azul não afectou o desenvolvimento dos embriões até blastócisto, o que vem de encontro ao já afirmado por Singh *et al.* (1982) e Tsuboi *et al.* (1997).

**Quadro 3:** Resultados da Média  $\pm$  DP, relativos ao desenvolvimento dos embriões nos diferentes tratamentos. Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão dos resultados de 4 manipulações ( $P>0.05$ ).

Média $\pm$ DP				
Amostras	n.º de ovócitos maturados	Taxa de fertilização	Taxa de clivagem	Taxa de embriões
Grupo Controlo ( <b>Grupo I</b> )	210	90,6 $\pm$ 3,4	78,0 $\pm$ 8,2	25,0 $\pm$ 8,8
Grupo experimental em meio MEM e contaminado com BTV-17 ( <b>Grupo II - a), b) e c)</b> )	623	88,8 $\pm$ 5,2	78,2 $\pm$ 11,4	21,2 $\pm$ 6,6
Grupo experimental em meio MEM ( <b>Grupo III</b> )	191	86,6 $\pm$ 5,2	74,5 $\pm$ 7,3	19,1 $\pm$ 6,2

## VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido principalmente às restrições comerciais que limitam a capacidade de exportação para países livres do vírus da língua azul, a doença acaba por apresentar maior impacto pelo seu efeito sobre o comércio internacional de animais e de germoplasma do que pelos efeitos clínicos da infecção sobre o efectivo animal. Assim, esforços contínuos são necessários para reduzir ao mínimo o risco de transmissão de doenças por via da IA (inseminação artificial) ou da TE (transferência de embriões).

Com a realização deste trabalho concluiu-se que:

- O vírus contamina os ovócitos utilizados na produção de embriões *in vitro*, mesmo estes tendo a zona pelúcida intacta;
- As 10 lavagens do protocolo IETS antes da transferência não são suficientes para que o vírus seja eliminado dos embriões;
- O vírus BTV-17 não afecta a fertilização e o desenvolvimento do zigoto, nas concentrações testadas, até ao 7º dia;
- O vírus não sendo eliminado nas lavagens e não afectando o desenvolvimento do embrião pode ser fonte de infecção cruzada via TE em animais sãos.

Ter-se ia de repetir em maior número as manipulações e testar outros meios de lavagem como por exemplo a tripsina, para aferir até que ponto o uso da mesma pode ser eficiente na remoção do vírus do BTV dos embriões para transferência, bem como a sua influência na viabilidade dos embriões após lavagem.

Seria de interesse futuramente desenvolver um estudo com vista a compreender a interação do serótipo 17 do vírus da língua azul (BTV-17) no ovócito, nomeadamente onde se fixa e se penetra a zona pelúcida mesmo que esta se encontre intacta.

Averiguar se o vírus, embora não influenciando o desenvolvimento dos embriões até ao sétimo dia, se tem efeito na qualidade dos mesmos ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento.

## VII - (a) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afssa - Agence française de sécurité sanitaire des aliments (2005). *Fievre Catarrhale Ovine*.  
Afssa – Saisine. SA- 0329.
- Ahid S.M.M. (2009). *Apostila didática. Entomologia Veterinária*. Ministério da Educação.  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró - RN. Acedido em 12 de Janeiro de  
2012. Anderson, C.K.; Jensen R. (1969). Pathologic changes in placentas of ewes inoculated  
with bluetongue virus. *Am. J. Vet. Res.* 30, 987-989.
- Al Ahmad M.Z., Pellerin J.L., Larrat M., Chatagnon G., Cécile R., Sailleau C., Zientara S., Fieni  
F. (2011). *Can bluetongue virus (BTV) be transmitted via caprine embryo transfer?*  
*Theriogenology*.
- Ansari M.A., Pope E.C., Carpenter S., Scholte E-J, Butt1 T.M. (2011). *Entomopathogenic  
Fungus as a Biological Control for an Important Vector of Livestock Disease: The  
Culicoides Biting Midge* PLoS ONE. January. Volume 6, Issue 1, 16108.
- Augot D., Depaqui J. (2010) *Problématique et enjeux de l'identification des espèces vectrices*.  
Bulletin épidémiologique N° 35, Hors-série, Spécial FCO en France.
- Aumont G., Lancelot R., Martinez D. (2009). *La FCO une maladie vectorielle émergente en  
Europe*. Inra Magazine, no. 8, 6-7.
- Backx, A., Heutink, R., van Rooij, E., van Rijn, P. (2009). *Transplacental and oral transmission  
of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection*. *Vet.  
Microbiol.*
- Bagley C.V. (1997). *Bluetongue in cattle*. Utah State University Extension. Animal Health Fact  
Sheet. AH/Beef/02.

- Baldet T., Delécolle J.-C., Mathieu B., La Rocque S., Roger F. (2004). *Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002*. *Epidemiology and vectors Vet. Ital.*, 40 (3), 226-231.
- Balenghien T. (2003). *Lutte anti-vectorielle ciblée dans le contrôle de la trypanosomose: l'exemple de la sideradougou*. These pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. École Nationale Vétérinaire. Toulouse.
- Barber T.L. (1979). *Temporal appearance, geographic distribution and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States*. *American Journal of Veterinary Research* 40, 1654-1656.
- Betteridge K.J. (2003). *A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques*. *Anim Reprod Sci.* 2003 Dec 15;79(3-4):203-44.
- Bourassa J.-P. (1991). *La métamorphose, clé du succès évolutif des insectes*. Document Technique n.º 19. Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Bowen R.A., Howard T.H., Pickett B.W. (1982). *Interaction of bluetongue virus with preimplantation embryos from mice and cattle*. *In Vitro, Journal Article, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Am J Vet Res*, Nov; 43(11):1907-11.
- CFSPH - The Center for Food Security & Public Health (2006). *Bluetongue*. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. BLU\_A200. CFSP.
- Campano L. (1957). *Rapport sur l'épizootie de fièvre catarrhale ovine 'langue bleue' en Espagne*. *Bulletin de l'office international des épizooties* 48, 605-11.
- Carpenter S., Wilson A., Barber J., Veronesi E., Mellor P., Venter G., Gubbins S. (2011). *Temperature Dependence of the Extrinsic Incubation Period of Orbiviruses in Culicoides Biting Midges*. *PLoS One.*; 6(11): e27987.

- Darpel K.E., Batten C.A., Veronesi E., Shaw A.E., Anthony S., Bachanek-Bankowska K., Kgosana L., bin-Tarif A., Carpenter S., Müller-Doblies U., Takamatsu H., Mellor P.S., Mertens P.P.C., Oura C.A.L. (2007). *Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe*. *Vet Rec*;161: 253– 61.
- De Clercq K., De Leeuw I., Verheyden B., Vandemeulebroucke E., Vanbinst T., Herr C., Méroc E., Bertels G., Steurbaut N., Miry C., De Bleecker K., Maquet G., Bughin J., Saulmont M., Lebrun M., Sustronck B., De Deken R., Hooyberghs J., Houdart P., Raemaekers M., Mintiens K., Kerkhofs P., Goris N., Vandenbussche F. (2008). *Transplacental infection and immunotolerance induced by a wild type bluetongue virus serotype 8 natural infection*. *Transbound Emerg Dis.*, 55, 352-359.
- Dunbar B.S. (1983) *Morphological, biochemical and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida*. *Mechanism and Control of Animal Fertilization* (JF Hartman, ed) Academic Press, New York, 139-175.
- European Commission DG ENV (2011). *Fungus could help control bluetongue disease* .News Alert Issue 232.
- European Commission - Health & Consumers Directorate-General (2010). *Programmes for the eradication, control and monitoring of certain animal diseases and zoonoses - Surveillance and Eradication programme of Bluetongue*. Uni 04 – Veterinary Control Programmes. SANCO/12887/2010. Latvia.
- FCO - Fièvre catarrhale du mouton (2008). *Lancement de la campagne de vaccination 2008 dans les Pyrénées-Atlantiques*. Note d’information. DDSV 64

- Fu, H., C. J. Leake, P. P. C. Mertens, and P. S. Mellor (1999) The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Arch. Virol.* 144:747–761. CrossRef, PubMed, CSA.
- Germanique L. A. (2010). *Aspects cliniques de la fièvre catarrhale ovine sérotype 8 chez les bovins. Thèse pour le doctorat vétérinaire.* La Faculté de Médecine de Créteil.
- Gibbs E.P., Greiner E. (1988). *Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease.* In: Monath, T.P. (ed) *The arbovirus: epidemiology and ecology*, vol II, Flórida: CRC Press inc., 39-70.
- Gibbs E.P.J; Greiner E.C. (1994). *The epidemiology of bluetongue.* *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* V.17, n.3/4, 207-220.
- Gourreau, J.M. (2009). *Fièvre catarrhale ovine.* *France agricole.* 136-146.
- Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. (2008). *Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus from goats Switzerland.* *Emerg Infect. Dis.* 14:1855–61. doi:10.3201/eid1412.080818
- Hutcheon D. (1902). *Malarial catarrhal fever of sheep.* *Vet. Rec.* 14, 629–633.
- IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (1986). *Trabajos Presentados durante Labsur IV.* Sanriago, Chile.
- Jauniaux T.P., De Clercq K.E., Cassart D.E., Kennedy S., Vandebussche F.E., Vandemeulebroucke E.L., Vanbinst T.M., Verheyden B.I., Goris N.E., Coignoul F.L. (2008). *Bluetongue in Eurasian lynx, Emerging Infectious Diseases.* 14:1496 – 8.
- Luigi, V. (2003). *L'épizootie de fièvre catarrhale ovine en Corse 2000-2002.* Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 112.
- LSI - Laboratoire service international (2011). *Kit TaqVet® BTVM – All genotype, TaqVet™ Bluetongue Virus All Genotypes FCO.* LSI – TaqVet™ BTV.

- Maan S., Maan N.S., Nomikou K., Batten C., Antony F., Belaganahalli M.N., Samy A.M., Reda A.A., Al-Rashid S.A., El Batel M., Oura C.A.L., Mertens P.P.C. (2011) *Novel bluetongue virus serotype from Kuwait*. *Emerg Infect Dis* 17: 886–889.
- MacLachlan NJ, Conley AJ, Kennedy PC. (2000). *Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion*. *Anim Reprod Sci.*;60–61:643–651.
- MacLachlan N.J. (2004). *Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia*. *Bluetongue virus and disease Vet. Ital.*, 40 (4), 462-467.
- Manso-Ribeiro J., Rosa-Azevedo J. A., Noronha , F.O., Braço-Forte-Junior M.C., Grave-Pereira C., Vasco-Fernandes M. (1957). *Fièvre catarrhale du mouton (bluetongue)*. *Bulletin de l'office international des épizooties* 48, 350-67.
- Mellor P.S. (1990). The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 162, 143-161.
- Mellor, P. S., Boorman, J., Baylis, M. (2000). *Culicoides* biting midges: *Their role as arbovirus vectors*. *Annual Review of Entomology* 45, 307±40.
- Meyer G., Lacroux C., Leger S., Top S., Goyeau K., Deplanche M., Lemaire M.(2009). *Lethal bluetongue virus serotype 1 infection in llamas*. *Emerging Infectious Diseases*;15:608 –10.
- Mertens P. P. C.; Maan S.; Samuel A.; Attoui H. (2004). *Orbivirus, Reoviridae*. In *Virus Taxonomy, VIII th Report of the ICTV*, 466–483. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. Elsevier/Academic Press, London.
- Nason E.L., Rothagel R., Mukherjee S.K., Kar A.K., Forzan M., Prasad B.V., Roy P. (2004). *Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus*. *J Virol* 78, 8059–8067.

- Nunes T., Fonseca I., Batista F., Martins H., Agrela Pinheiro C., Luciente J., Boinas, F. (2009). *Bluetongue in Portugal and Culicoides sp distribution between 2005-2008. Abstracts Book – Medreonet third annual meeting*, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2010). Code sanitaire pour les animaux terrestres. *Bluetongue*. Chapter 8.3.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2011). Code sanitaire pour les animaux terrestres - *Collecte et manipulation des ovocytes/embryons du bétail et d'équidés produits in vitro*. Chapitre 4.8.
- Parsonson, I.M., (1992). *Overview of bluetongue virus infection in sheep*, in Walton T.E., Osburn B.I. (eds.), *Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses*, pp. 713–724, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Perie, P.P, Chermette R., Millemann Y., Zientara S. (2005). *Les Culicoides, Diptères hématophages vecteurs de la fièvre catarrhale du mouton*. Mémoire. Bull. Acad. Vét. France; Tome - N°.158.
- Pombo S. (2011). *Língua azul – Lingua Azul*. DGV. Edital N. ° 28.Lisboa.
- Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P.C., Baylis M. (2005). *Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe*. Nat. Rev. Microbiol. 3, 171–181.
- Rodrigues L. (2008). *Epidemiologia e estudo entomológico dos potenciais vectores do vírus da Língua azul na região do Vale do Tejo*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa.
- Rossitto P.V., MacLachlan N.J. (1992). *Neutralizing epitopes of the serotypes of bluetongue virus present in the United States*. Journal of General Virology 73, 1947-1952.

- Roy P. (1989). *Bluetongue virus genetics and genome structure*. Virus Res., v. 13, 1989, 179–206.
- Saegerman C., Berkvens D. e Mellor P.S. (2008). *Bluetongue Epidemiology in the European Union*. Emerging Infectious Diseases. Vol. 14, N.º. 4.
- Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S., (2008). *Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity*. Vet. Res. 39, 46.
- Sellers R.F., Pedgley E., Tucker M.R. (1978). *Possible windborne spread of bluetongue to Portugal, June-July 1956*. J. Hyg., Camb. 81, 189-189.
- Singh E.L., Eaglesome, M.D., Thomas, F.C., Papp-Id. G., Hare, W.C.D. (1982). *Embryon transfer as a means of controlling the transmission of viral infections: I. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, bluetongue and bovine viral diarrhea viruses*. Theriogenology 17. 437-444.
- Smith B.P. (2006) *Medicina Interna de Grandes Animais*. Barueri S.P., 3ªed, Manole, p.702.
- Spreull J. (1905). *Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa*. J. Comp. Pathol. Thera. 18, 321
- Stott J.L., Osburn B.I., MacLachlan N.J. (1983). *Diagnosis of bluetongue virus infection in cattle: virus isolation or serology*. Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 26, 301–318.
- Stringfellow D.A. (1990). *Les recommandations pour la manipulation sanitaire des embryons produits in vivo*. Manuel de l'IETS Chapitre 6. 83-86.
- Tabachnick W.J. (2010). *Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistemics in a changing world*. Exp Biol 213, 946-954.

- Takamatsu H., Mellor P. S., Mertens P. P. C., Kirkham P. A., Burroughs J. N., Parkhouse R. M. E. (2002). *A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector*. *Journal of General Virology* 84, 227–235.
- Technical Review – Bluetongue (2002). *The Virus, Hosts and Vectors*. Version 1.5.
- Thiry E., Saegerman C., Guyot H., Kirten P., Losson B., Rollin F., Bodmer M., Czaplicki G., Toussaint J-F., De Clercq K., Dochy J-M., Dufey J., Gillemann J-L., Messeman K. (2006). *Bluetongue in northern Europe*. *Veterinary Record* 159, 327.
- Thomas F.C., Singh E.L., Hare W.C.D. (1985). *Embryo transfer as a means of controlling viral infections*. VI. *Bluetongue virus-free calves from infectious semen*, *Theriogenology* 24, 345–350.- Abstract.
- Tomich R.G.P., Pellegrin A.O., Campos F.S., Lobato Z.I.P., Stancioli E.F.B.(2006). *Epidemiologia do vírus da língua azul em rebanhos bovinos*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Corumbá.
- Tse C., Brault D., Gligorov J., Antoine M., Neumann R., Lotz J.P., Capeau J. (2005). *Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients*. *Clin Chem*, 51:1093-1101.
- Tsuboi T., Imada T. (1997). *Effect of bovine herpes virus- 1, bluetongue virus and akabane virus on the in vitro development of bovine embryos*. *Veterinary Microbiology* 51; 135-142.

- Van der Sluijs M, Timmermans M, Moulin V, Noordegraaf CV, Vrijenhoek M, Debyser I, de Smit A.J., Moormann R.(2011). *Transplacental transmission of Bluetongue virus serotype 8 in ewes in early and mid gestation*. *Vet Microbiol*; 149(1–2):113–25.
- Vannier P., Hartung J., Sharp J.M., Bøtner A., Broom D.M., Doherr M.G., Domingo M., Keeling L., Koenen F., More S., Morton D., Oltenacu P., Osterhaus A., Salati F., Salman M., Sanaa M., Stegeman J.A., Szücs E., Thulke H.-H., Webster A.J.F., Wierup M. (2011). *Scientific Opinion on bluetongue serotype 8*. *EFSA Journal*; 9(5):2189. [51 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2189.
- Vega S., Tolari F., Garcia A., Gomez T., Fernandez S., Galiana C., Cavini S., Pérez T. ( 2004). *Lengua azul – Fiebre catarral ovina*. *Profesión veterinaria*, Vol. 15, Nº. 60, 14-23.
- Vercauteren, G., Miry, C., Vandenbussche, F., Ducatelle, R., Van der Heyden, S., Vandemeulebroucke, E., De Leeuw, I., Deprez, P., Chiers, K., De Clercq, K. (2008). *Bluetongue Virus Serotype 8-Associated Congenital Hydranencephaly in Calves*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55: 293–298. doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01034.x.
- Viville, J-S. (2010). *Efficacité d'un vaccin inactivé contre une inoculation d'épreuve A BTV-8 réalisée sur des béliers reproducteurs une semaine avant la période officielle de couverture semence*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 86.
- Walton T.E. (2004). *The history of bluetongue and a current global overview*. *Vet. Ital.*, 40 (3), 31-38.
- White, D.M., Wilson, W.C., Blair, C.D., Beaty, B.J., (2005). *Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects*. *J.Gen.Virol.* 86, 453–462.

- Wilson A, Mellor P (2008) *Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change*. Parasitology Research, 103, S69eS77
- Wilson A. J., Mellor P.S. (2009). *Bluetongue in Europe: past, present and future*. Phil. Trans. R. Soc. B; 364, 2669-2681.
- Wrathall AE, Simmons HA, Van Soom A.(2006) *Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen*. Theriogenology. Theriogenology 65, 247–274.
- Zientara S.; Sailleau C.; E Bréard; et HammoumS. (2002). *Intérêt des outils moléculaires dans le diagnostic*. Epidémiol. et santé anim., 42, 109-113.

## VII - (b). REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ELECTRÓNICAS

Swiss Institute of Bioinformatics. *Orbivirus*. ViralZone. In:

[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/106.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/106.html). Acedido em 10 de Fevereiro de 2012.

UNCEIA - Unión Nationale dès Coopératives Agricoles d'Elevage et d'Insemination Artificiele.

*L'insémination animale en France. Les techniques utilisées - Le transfert embryonnaire.*

In: <http://www.unceia.fr> Acedido em 15 de Novembro de 2011..

Utah State University (2012). Differential Effects of RNAi on Toll-Like Receptors in Human A549, A498, HEP-G2, and HEK-293 Cells Infected with Oncolytic Bluetongue Virus. <http://uaes.usu.edu/htm/aes-news/christopher-luke-peterson-and-joseph-li/>. Acedido em 1 Março de 2012.

## ANEXOS

### Anexo I \_ PBS - *Phosphate Buffered Saline*

Composição	Quantidade
CaCl <sub>2</sub>	0,10g/L
KCl	0,20g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20g/L
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,10g/L
NaCl	8g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,16g/L
+	
Sulfato de kanamicina	0,05mg/L
Albumina sérica bovina	0,15% (p/v)

## Anexo II \_ Meio de Colecta dos Ovócitos

Composição	Quantidade
CaCl <sub>2</sub>	0,10g/L
KCl	0,20g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20g/L
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,10g/L
NaCl	8g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,16g/L
+	
Sulfato de kanamicina	0,05mg/L
Albumina sérica bovina	0,15% (p/v)

## Anexo III \_ Meio de Maturação

Composição	Quantidade
199 Hapes	8,5mL
SVH	1,5mL
Gentamicina	100µL
E <sub>2</sub> 17β	10µL
EGF	10µL
FSH/LH ou LH	100µL ou 10µL
<i>Filtro steriflip</i>	
Estufa Gaseificada com CO <sub>2</sub>	

**Anexo IV \_ Mistura PHE - (penicillamine, hypotaurine e epinephrine)**

Composição	Quantidade
CaCl <sub>2</sub>	0,10g/L
KCl	0,20g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20g/L
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,10g/L
NaCl	8g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,16g/L
+	
Sulfato de kanamicina	0,05mg/L
Albumina sérica bovina	0,15% (p/v)

**Anexo V \_ Meio FIV – (fertilização *in vitro*)**

Composição	Quantidade (µL)
Meio IVFTL	450
Mistura PHE	20
Uma quantidade <i>ad hoc</i> de heparina	
Estufa gaseificada com CO <sub>2</sub>	

## Anexo VI \_ Meio IVFTL – (TL - Fertilization medium)

	10mL	20mL	30mL	40mL	50mL
IVF stock	10mL	20mL	30mL	40mL	50mL
BSA FAF	60mg	120mg	180mg	240mg	300mg
PS	10µL	20µL	30µL	40µL	50µL
Piruvato stock	100µL	200µL	300µL	400µL	500µL
Piruvato stock: 22 mg/10 mL NaCl Ajustar o pH a 7,6 (HCl) Filtro <i>steriflip</i> Estufa gaseificada com CO <sub>2</sub>					

## Anexo VII \_ Quadro de diluição do esperma

Diluição em 500 µL para uma concentração final de 10 <sup>6</sup> spz/mL			
Nb spz contados	Volume de esperma (µL)	Nb spz contados	Volume de esperma (µL)
400	1,135	130	3,85
425	1,175	125	4
410	1,22	120	4,17
400	1,25	115	4,35
395	1,26	112,5	4,4
375	1,33	110	4,54
350	1,42	105	4,76
325	1,53	100	5
300	1,65	95	5,26
275	1,82	90	5,55
250	2	85	5,88
225	2,2	80	6,25
200	2,5	75	6,7
190	2,63	70	7,14
180	2,77	65	7,69
175	2,85	60	8,33
170	2,94	55	9,09
165	3,03	50	10,0
160	3,125	45	11,1
155	3,22	40	12,5
150	3,3	35	14,3
145	3,45	30	16,7
140	3,57	25	20
137,5	3,64	20	25
135	3,7	15	33,4

**Anexo VIII \_ Meio de cultura - SOF (*Synthetic Oviduct fluid*)**

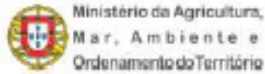
<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>
SOF stock	10mL
Gentamicina	100µL
PS	10µL
Nistatina	10µL
BSA Fr V A-9647	30mg
Filtro <i>millex</i>	
Estufa gaseificada com CO <sub>2</sub>	

## Anexo IX \_ Meio MEM (*Mínimo Essencial Medium*)

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	mM
<b>Aminoácidos</b>			
Hydrocloroto de L-Arginina	211	126	0.597
L-Cistina 2HCl	313	31	0.099
L-Glutamina	146	292	2
Dihidrocloroto de L-Cistina	210	42	0.2
L-Isoleucina	131	52	0.397
L-Leucina	131	52	0.397
L-Lisina HCl	183	73	0.399
L-Metionina	149	15	0.101
L-Fenilalanina	165	32	0.194
L-Treonina	119	48	0.403
L-Triptofano	204	10	0.049
L-Tirosina (sal 2Na)	261	52	0.199
L-Valina	117	46	0.393
<b>Vitaminas</b>			
Cloreto de colina	140	1	0.00714
D-Ca-Pantotenat	477	1	0.0021
Ácido Fólico	441	1	0.00227

Nicotinamida	122	1	0.0082
Hidrocloro Piridoxal	204	1	0.0049
Riboflavina	376	0.1	0.000266
Hidrocloro de Tiamina	337	1	0.00297
i-Inositol	180	2	0.0111
<b>Sais inorgânicos</b>			
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	111	200	1.8
Sulfato de Magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	120	97.67	0.814
Cloreto de Potássio (KCl)	75	400	5.33
Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	84	2200	26.19
Cloreto de Sódio (NaCl)	58	6800	117.24
Fosfato de Sódio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	138	140	1.01
<b>Outros componentes</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	1000	5.56
Phenol Red	376.4	10	0.0266

# Anexo X \_ Edital n.º 29/2011 – Febre Catarral Ovina/Língua Azul



Ministério da Agricultura,  
Mar, Ambiente e  
Ordenamento do Território

DGV  
Direcção-Geral  
de Veterinária

## EDITAL N.º 29

### FEBRE CATARRAL OVINA LÍNGUA AZUL

Nuno Vieira e Brito, Director-Geral de Veterinária, na qualidade de Autoridade Sanitária Veterinária Nacional, torna público que:

A língua azul ou febre catarral ovina é uma doença epizootica de etiologia vírica que afecta os ruminantes, com transmissão vectorial, incluída na lista de doenças de declaração obrigatória nacional e europeia e no código sanitário para os animais terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

As medidas de combate à doença estão estabelecidas no Decreto-Lei n.º 146/2002, de 21 de Maio e na Directiva 2000/75/CE do Conselho, cujas disposições de aplicação foram modificadas pela adopção do Regulamento (CE) n.º 1266/2007, da Comissão, de 26 de Outubro, com as alterações que lhe foram introduzidas pelos Regulamentos (CE) n.º 289/2008 de 31 de Março, n.º 384/2008 de 29 de Abril, n.º 394/2008 de 30 de Abril, n.º 708/2008 de 24 de Julho, n.º 1108/2008 de 7 de Novembro, n.º 123/2009 de 10 de Fevereiro e n.º 789/2009 de 28 de Agosto, da Comissão.

O serótipo 4 do vírus da língua azul circulou no território nacional continental desde Novembro de 2004 e uma vez decorridos dois anos desde a última evidência de circulação viral, Portugal declarou-se livre deste serótipo em Março de 2010, ao abrigo do constante do código sanitário para os animais terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

Face à considerável redução de risco de reentrada do vírus do serótipo 4 da língua azul, associada à elevada cobertura vacinal obtida nos dois últimos anos na zona submetida a restrição sem circulação viral que abrangia os concelhos de Mértola, Alcoutim, Castro Marim, Vila Real de Santo António, Tavira, S. Braz de Alportel, Oihão, Faro e Loulé, entendeu-se suspender a vacinação neste cordão sanitário e assim suprimir a zona submetida a restrição sem circulação viral.

O serótipo 1 do vírus da língua azul circula em Portugal desde Setembro de 2007, sendo as medidas de controlo implementadas sucessivamente adaptadas em função da evolução epidemiológica da doença e de avaliação de risco que tem por base os resultados dos planos de vigilância clínica, serológica, virológica, entomológica e a avaliação dos dados meteorológicos.

Durante o ano de 2011 apenas ocorreu um foco do serótipo 1 da língua azul, detectado através do plano de vigilância em curso, sem qualquer sintomatologia clínica, após um silêncio epizootico de 12 meses face à ocorrência de seis focos do serótipo 1 da língua azul em 2010.

O conjunto de medidas desenvolvidas nos últimos anos, nomeadamente o plano de vigilância, as campanhas de vacinação e o controlo da movimentação animal contribuíram de forma determinante para esta melhoria da situação epidemiológica.



A evolução favorável do serótipo 1 da língua azul no ano de 2011 aliada a uma elevada taxa de cobertura vacinal obtida nos últimos quatro anos permite a redefinição da estratégia vacinal a implementar no ano de 2012.

Encontram-se assim reunidas as condições para cessar a vacinação obrigatória contra o serótipo 1 da língua azul a partir de 1 de Janeiro de 2012 em bovinos e nos ovinos excepto nos concelhos de Idanha-a-Nova, Castelo Branco e Vila Velha de Ródão, onde, da avaliação de risco acrescido de circulação viral e da análise dos dados do plano entomológico, se infere da necessidade de se manter a vacinação obrigatória nos ovinos desses concelhos.

Por outro lado, da análise de risco efectuada, através da monitorização dos dados do plano de vigilância, avaliação dos valores dos indicadores entomológicos e meteorológicos é possível concluir que não existe evidência de actividade do vector preferencial para a transmissão do serótipo circulante do vírus da língua azul no território nacional continental.

Assim, ao abrigo do disposto nos artigos 8º, 9º e 10º do Decreto-Lei nº 146/2002, de 21 de Maio, e do Regulamento (CE) nº 1266/2007 da Comissão de 26 de Outubro, com as alterações que lhe foram introduzidas pelos Regulamentos (CE) nº 289/2008 de 31 de Março, nº 384/2008 de 29 de Abril, nº 394/2008 de 30 de Abril, nº 708/2008 de 24 de Julho, nº 1108/2008 de 7 de Novembro, nº 123/2009 de 10 de Fevereiro e nº 789/2009 de 28 de Agosto, da Comissão, determino o seguinte:

1. A área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul, é constituída pela totalidade do território nacional continental.
2. As áreas das regiões autónomas dos Açores e da Madeira constituem uma zona livre de língua azul.
3. É obrigatória a vacinação contra o serótipo 1 da língua azul dos ovinos existentes nos concelhos de Idanha-a-Nova, Castelo Branco e Vila Velha de Ródão da área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul, mediante a vacinação ou revacinação com vacina inactivada do efectivo ovino reprodutor adulto e dos jovens destinados à reprodução a partir dos 6 meses de idade.
4. São requisitos gerais para a movimentação de ruminantes dentro do território nacional continental os seguintes:
  - 4.1. Os animais a movimentar bem como os animais do efectivo de origem não podem apresentar qualquer suspeita de língua azul à data do transporte;
  - 4.2. Os animais da espécie ovina com mais de 6 meses de idade dos concelhos de Idanha-a-Nova, Castelo Branco e Vila Velha de Ródão devem estar vacinados contra o serótipo 1 da língua azul;
  - 4.3. Os animais devem ser acompanhados durante o transporte pelos respectivos documentos de identificação, deslocação e circulação, em conformidade com a legislação específica.
5. Os animais provenientes de explorações situadas em área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul, podem movimentar-se para vida ou abate, directamente para o território de outros Estados-membros e para zona livre de Portugal desde que:



5.1. Sejam integralmente cumpridas as condições estabelecidas no Regulamento (CE) n.º 1266/2007 da Comissão de 26 de Outubro, com as alterações que lhe foram introduzidas pelos Regulamentos (CE) n.º 289/2008 de 31 de Março, n.º 384/2008 de 29 de Abril, n.º 394/2008 de 30 de Abril, n.º 708/2008 de 24 de Julho, n.º 1108/2008 de 7 de Novembro, n.º 123/2009 de 10 de Fevereiro e n.º 789/2009 de 28 de Agosto, da Comissão.

5.2. Apenas serão emitidos certificados sanitários para acompanhamento dos animais após verificação do cumprimento dos requisitos constantes de 5.1

6. A movimentação de touros de lide é sujeita às condições definidas nos pontos 4 e 5.
7. É permitida, de forma opcional, a vacinação contra o serótipo 1 da língua azul, dos bovinos existentes na área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul e dos ovinos existentes nos concelhos do território nacional continental não abrangidos pelo ponto 3, de acordo com as especificações técnicas da vacina utilizada, devendo ser registadas nos respectivos documentos de identificação a vacina utilizada e a data das inoculações.

7.1. O disposto no Despacho n.º 7337/2009 de 17 de Fevereiro, publicado no Diário da Republica de 11 de Março e respectivas alterações, não é aplicável à vacinação contra o serótipo 1 da língua azul que se realiza de forma opcional, não sendo a sua aplicação requisito obrigatório para a movimentação dos animais no território nacional continental;

7.2. A vacina contra o serótipo 1 da língua azul é fornecida gratuitamente pelo Estado às Organizações de Produtores Pecuários (OPP) cujos médicos veterinários procedem à aplicação da vacina.
8. A comunicação de quaisquer sinais da doença nos efectivos de origem dos animais a movimentar é da responsabilidade do respectivo detentor, de acordo com o Decreto-Lei 64/2000 de 22 de Abril.
9. Sem prejuízo do disposto no número anterior a observação clínica dos efectivos suspeitos tendo em vista a confirmação da doença, compete às direcções de serviços de veterinária das regiões, podendo tais competências ser exercidas pelas OPP nos termos previstos no n.º 2 do Artigo 3º da Portaria n.º 178/2007 de 9 de Fevereiro com as alterações que lhe foram introduzidas pela Portaria n.º 1004/2010, de 1 de Outubro e pela Portaria n.º 96/2011, de 8 de Março, pelos médicos veterinários municipais ou por outros médicos veterinários designados para o efeito pelas direcções de serviços de veterinária das regiões.
10. A vacinação dos animais nos efectivos da área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul, será efectuada pelas OPP de acordo com o determinado em Despacho publicado ao abrigo do n.º 2 do art.º 3 da Portaria 178/2007 de 9 de Fevereiro com as alterações que lhe foram introduzidas pela Portaria n.º 1004/2010, de 1 de Outubro e pela Portaria n.º 96/2011, de 8 de Março, ou por outras entidades expressamente designadas pela Direcção Geral de Veterinária.
11. Os resultados das análises dos testes de pré-movimentação têm uma validade máxima de 10 dias após a colheita.



12. O transporte de sêmen, óvulos e embriões com origem na área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul, deve obedecer ao determinado no Regulamento (CE) n.º 1266/2007 da Comissão de 26 de Outubro com as alterações que lhe foram introduzidas pelos Regulamentos (CE) n.º 289/2008 de 31 de Março, n.º 384/2008 de 29 de Abril, n.º 394/2008 de 30 de Abril, 708/2008 de 24 de Julho, n.º 1108/2008 de 7 de Novembro, n.º 123/2009 de 10 de Fevereiro e n.º 789/2009 de 28 de Agosto, da Comissão.
13. Pode ser autorizado o movimento e uso na área geográfica sujeita a restrições por serótipo 1 da língua azul, agora designada como sazonalmente livre de língua azul, de sêmen proveniente de ovinos de explorações localizadas nos concelhos abrangidos pelo ponto 3, desde que os animais dadores sejam vacinados contra o serótipo 1 da língua azul, mediante o cumprimento dos requisitos previstos naquele ponto.
14. Os transportadores são obrigados a:
  - 14.1. Não transportar animais que não se encontrem nas condições estabelecidas no presente Edital, ou que não sejam acompanhados dos documentos previstos em legislação específica;
  - 14.2. Verificar, antes do embarque dos animais, que estes se encontram identificados nos termos da legislação específica.
15. As infracções ao presente Edital são punidas nos termos dos Decretos-Lei n.ºs 146/2002, de 21 de Maio, 64/2000 de 22 de Abril e 142/2006 de 27 de Julho.
16. Este Edital entra imediatamente em vigor e revoga o Edital n.º 28, solicitando-se a todas as autoridades veterinárias, policiais e administrativas que fiscalizem o seu integral e rigoroso cumprimento.

Direcção-Geral de Veterinária, 23 de Dezembro de 2011

O DIRECTOR GERAL

*(Nuno Vieira e Brito)*

# Anexo XI \_ 2012/C 46 E/02

17.2.2012

PT

Jornal Oficial da União Europeia

C 46 E/15

## POSIÇÃO (UE) N.º 5/2012 DO CONSELHO EM PRIMEIRA LEITURA

tendo em vista a adoção da Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho que altera a Diretiva 2000/75/CE no que respeita à vacinação contra a febre catarral ovina

Adotada pelo Conselho em 15 de dezembro de 2011

(2012/C 46 E/02)

O PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia, nomeadamente o artigo 43.º, n.º 2,

Tendo em conta a proposta da Comissão Europeia,

Após transmissão do projeto de ato legislativo aos parlamentos nacionais,

Tendo em conta o parecer do Comité Económico e Social Europeu<sup>(1)</sup>,

Deliberando de acordo com o processo legislativo ordinário<sup>(2)</sup>,

Considerando o seguinte:

- (1) A Diretiva 2000/75/CE do Conselho, de 20 de novembro de 2000, que aprova disposições específicas relativas às medidas de luta e de erradicação da febre catarral ovina ou língua azul<sup>(3)</sup>, define regras de controlo e medidas de luta contra a febre catarral ovina, nomeadamente medidas de erradicação, incluindo regras relativas ao estabelecimento de zonas de protecção e vigilância e à utilização de vacinas contra a febre catarral ovina.
- (2) No passado, só esporadicamente se registaram na União incursões de alguns serótipos do vírus da febre catarral ovina. Essas incursões ocorreram principalmente em zonas meridionais da União. Contudo, desde a adopção da Diretiva 2000/75/CE e, em especial, desde a introdução na União dos serótipos 1 e 8 do vírus da febre catarral ovina, em 2006 e 2007, o vírus da febre catarral ovina generalizou-se na União, com potencial para se tornar endémico em certas áreas. Tornou-se, pois, difícil controlar a propagação desse vírus.
- (3) As regras relativas à vacinação contra a febre catarral ovina estabelecidas na Diretiva 2000/75/CE baseiam-se na experiência adquirida com a utilização das chamadas «vacinas vivas modificadas» ou «vacinas vivas atenuadas»,

que eram as únicas vacinas disponíveis aquando da adopção da directiva. A utilização dessas vacinas pode conduzir também a uma circulação local indesejável do vírus da vacina em animais não vacinados.

- (4) Nos últimos anos, em resultado das novas tecnologias, ficaram disponíveis «vacinas inactivadas» contra a febre catarral ovina, que não constituem um risco de circulação local indesejável do vírus da vacina para os animais não vacinados. A generalização da utilização destas vacinas durante a campanha de vacinação em 2008 e 2009 deu origem a uma melhoria significativa da situação sanitária. É hoje consensual que a vacinação com vacinas inactivadas é o melhor instrumento para o controlo da febre catarral ovina e para a prevenção da doença clínica na União.
- (5) A fim de garantir um melhor controlo da propagação do vírus da febre catarral ovina e reduzir os encargos que pesam sobre o sector agrícola devido a esta doença, convém alterar as regras vigentes em matéria de vacinação estabelecidas na Diretiva 2000/75/CE, para ter em conta a recente evolução tecnológica da produção de vacinas.
- (6) A fim de permitir que a campanha de vacinação de 2012 beneficie das novas regras, a presente directiva deverá entrar em vigor no dia seguinte ao da sua publicação no Jornal Oficial da União Europeia.
- (7) As alterações previstas na presente directiva deverão tornar as regras de vacinação mais flexíveis e ter igualmente em conta o facto de estarem actualmente disponíveis vacinas inactivadas, que também podem ser utilizadas com êxito fora das zonas sujeitas a restrições à circulação de animais.
- (8) Por outro lado e desde que se tomem medidas cautelares adequadas, não deverá excluir-se a utilização de vacinas vivas atenuadas, dado que tal utilização poderá ainda ser necessária em certas circunstâncias, como, por exemplo, após a introdução de um novo serótipo do vírus da febre catarral ovina, contra o qual podem não existir vacinas inactivadas.
- (9) A Diretiva 2000/75/CE deverá, por conseguinte, ser alterada.

<sup>(1)</sup> JO C 132 de 3.5.2011, p. 92.

<sup>(2)</sup> Posição do Parlamento Europeu de 7 de abril de 2011 (ainda não publicada no Jornal Oficial).

<sup>(3)</sup> JO L 327 de 22.12.2000, p. 74.

ADOPTARAM A PRESENTE DIRETIVA:

Artigo 1.º

A Diretiva 2000/75/CE é alterada do seguinte modo:

1) Ao artigo 2.º é aditada a seguinte alínea:

«f) "Vacinas vivas atenuadas", vacinas produzidas por adaptação de isolados do vírus da febre catarral ovina através de passagens em série na cultura de tecidos ou em ovos de galinha embrionados.»

2) O artigo 5.º passa a ter a seguinte redacção:

«Artigo 5.º

1. A autoridade competente de um Estado-Membro pode decidir autorizar a utilização de vacinas contra a febre catarral ovina desde que:

a) Essa decisão seja tomada com base no resultado de uma avaliação de riscos específica realizada pela autoridade competente;

b) A Comissão seja informada antes de a vacinação ser efectuada.

2. Caso sejam utilizadas vacinas vivas atenuadas, os Estados-Membros devem assegurar que a autoridade competente delimita:

a) Uma zona de protecção, constituída, pelo menos, pela zona de vacinação;

b) Uma zona de vigilância, constituída por uma parte do território da União com uma extensão mínima de 50 quilómetros para além dos limites da zona de protecção.»

3) No artigo 6.º, n.º 1, a alínea d) passa a ter a seguinte redacção:

«d) Põe em prática as medidas adoptadas nos termos do n.º 2 do artigo 10.º, nomeadamente no que se refere à execução de um programa de vacinação ou de outras medidas alternativas.»

4) No artigo 8.º, n.º 2, a alínea b) passa a ter a seguinte redacção:

«b) A zona de vigilância deve ser constituída por uma parte do território da União com uma extensão mínima de 50 quilómetros para além dos limites da zona de protecção e na qual não tenha sido feita qualquer vacinação contra a febre catarral ovina com vacinas vivas atenuadas no decurso dos últimos 12 meses.»

5) No artigo 10.º, o ponto 2 passa a ter a seguinte redacção:

«2. Seja proibida qualquer vacinação contra a febre catarral ovina com vacinas vivas atenuadas na zona de vigilância.»

Artigo 2.º

1. Os Estados-Membros adoptam e publicam, até ... (\*), as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Os Estados-Membros comunicam imediatamente à Comissão o texto dessas disposições.

Os Estados-Membros aplicam essas disposições a partir de ... (\*\*).

Quando os Estados-Membros adoptarem essas disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência são estabelecidas pelos Estados-Membros.

2. Os Estados-Membros comunicam à Comissão o texto das principais disposições de direito interno que aprovarem nas matérias reguladas pela presente directiva.

Artigo 3.º

A presente directiva entra em vigor no dia seguinte ao da sua publicação no Jornal Oficial da União Europeia.

Artigo 4.º

Os destinatários da presente directiva são os Estados-Membros.

Feito em ..., em ...

Pelo Parlamento Europeu

O Presidente

...

Pelo Conselho

O Presidente

...

(\*) Seis meses após a data de entrada em vigor da presente directiva.  
(\*\*) Seis meses e um dia após a data de entrada em vigor da presente directiva.

## NOTA JUSTIFICATIVA DO CONSELHO

## I. INTRODUÇÃO

Em 15 de novembro de 2010, a Comissão enviou ao Conselho uma proposta de diretiva do Conselho, baseada no artigo 15.º da Diretiva 92/119/CEE do Conselho<sup>(1)</sup>. Na sequência do parecer do Serviço Jurídico do Conselho, a base jurídica derivada da proposta da Comissão foi substituída pelo artigo 43.º, n.º 2, do TFUE, que implica o processo legislativo ordinário<sup>(2)</sup>.

O Parlamento Europeu deu parecer em 7 de abril de 2011<sup>(3)</sup>.

O Comité Económico e Social adotou o seu parecer em 15 de março de 2011<sup>(4)</sup>.

De acordo com o artigo 294.º do Tratado, o Conselho adotou a sua posição em primeira leitura em 15 de dezembro de 2011.

## II. OBJETIVOS

O projeto de diretiva visa atualizar as atuais normas em matéria de vacinação contra a febre catarral ovina previstas na Diretiva 2000/75/CE, tornando-as mais flexíveis. A febre catarral ovina é uma doença que afeta os ruminantes (como os bovinos, os ovinos e os caprinos) e é transmitida por insetos vetores que propagam o vírus de um animal para outro. A vacinação é o meio preferencial para o controlo da febre catarral ovina e a prevenção da doença clínica na UE. O uso de vacinas é, no entanto, limitado pelas normas atuais previstas na Diretiva 2000/75/CE, que prevê o uso de vacinas somente em zonas onde a doença ocorreu e que foram, portanto, sujeitas a restrições dos movimentos de animais. Estas normas baseiam-se em experiências com as chamadas «vacinas vivas modificadas» ou «vacinas vivas atenuadas», que eram as únicas vacinas disponíveis aquando da adoção da diretiva há dez anos. Essas vacinas podem dar azo a uma circulação indesejável do vírus da vacina em animais não vacinados, nas regiões em que a vacina tiver sido utilizada. As novas normas flexíveis previstas no projeto de diretiva baseiam-se no facto de estarem atualmente disponíveis vacinas inativadas, que também podem ser utilizadas com êxito fora das zonas sujeitas a restrições à movimentação de animais.

## III. ANÁLISE DA POSIÇÃO DO CONSELHO

A posição do Conselho confirma os objetivos propostos pela Comissão e incorpora a quase totalidade das alterações do Parlamento Europeu em primeira leitura.

Em particular, o Conselho comunga da posição do Parlamento Europeu de que o artigo 43.º, n.º 2, do TFUE é a base jurídica correta para esta diretiva. Este ponto de vista foi confirmado pelo Coroper (1.ª Parte) que, na sequência do parecer do Serviço Jurídico do Conselho contra a utilização de uma base jurídica derivada para esta proposta, decidiu na sua reunião de 26 de janeiro de 2011 propor ao Parlamento Europeu a alteração da base jurídica pelos co-legisladores, atendendo a que os serviços da Comissão foram incapazes de se comprometer a representar rapidamente a proposta com esta base jurídica alterada<sup>(5)</sup>.

A posição do Conselho introduz alterações ao parecer do Parlamento Europeu em primeira leitura em apenas dois aspetos:

1. Enquanto todos os outros requisitos propostos relacionados com a comunicação das disposições nacionais à Comissão são mantidos na posição do Conselho, a obrigação específica de utilizar as tabelas de correspondência é suprimida. O Conselho considera que este aspeto está de acordo com a conclusão alcançada nas negociações horizontais entre as Instituições sobre a questão das tabelas de correspondência e toma nota da confirmação pelo representante da Comissão de que a sua Instituição não considera que este requisito específico se justifique para a presente diretiva.
2. A outra alteração diz respeito ao prazo para a transposição da diretiva na legislação nacional.

(1) Diretiva 92/119/CEE do Conselho, de 17 de dezembro de 1992, que estabelece medidas comunitárias gerais de luta contra certas doenças animais, bem como medidas específicas respeitantes à doença varicelosa do suíno (JO L 62 de 15.3.1993, p. 69).

(2) Doc. 5498/11.

(3) P7\_TA-PROV(2011)0147.

(4) NAT/512 – CESE 538/11.

(5) Docs. 5498/11 e 5499/11.