



CIÊNCIAS VETERINÁRIAS 2008

IV Congresso da SPCV
I Congresso Ibérico de Epidemiologia

Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB),
INIA / Fonte Boa, Vale de Santarém
27, 28 e 29 de Novembro



RESUMOS das COMUNICAÇÕES

SOCIEDADE PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CONGRESSO CIÊNCIAS VETERINÁRIAS 2008

LIVRO DE RESUMOS

VETERINARY SCIENCES CONGRESS 2008

PROCEEDINGS

INRB INIA/Fonte Boa, Santarém

27, 28 e 29 de Novembro de 2008

Edição: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

Comissão de Honra

Sua Excelência O Presidente da República, Prof. Doutor Aníbal Cavaco Silva
Ministro da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas, Dr. Jaime Silva
Ministro da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Prof. Doutor José Mariano Gago
Secretário de Estado Adjunto da Agricultura e Pescas, Dr. Luís Medeiros Vieira
Presidente da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Prof. Doutor João Sentieiro
Presidente do Conselho Executivo da FLAD, Prof. Doutor Rui Chancerelle de Machete
Directora do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, Dr^a. Maria Rosa Tobias Sá
Governador Civil de Santarém, Dr. Paulo Alexandre Homem de Oliveira Fonseca
Presidente da Câmara Municipal de Santarém, Dr. Francisco Maria Moita Flores
Bastonário da Ordem dos Médicos Veterinários, Dr. João Pedro Sameiro de Sousa
Presidente do Sindicato Nacional dos Médicos Veterinários, Dr. Francisco Camacho
Director do LNIV/INRB, Doutora Alice Amado
Director do INIA-Fonte Boa/ INRB, Doutor João Ramalho Ribeiro
Director-Geral de Veterinária, Dr. Carlos Agrela Pinheiro
Presidente do Conselho Directivo da FMV - UTL, Prof. Doutor Luís Tavares
Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária - UTAD, Prof^a Doutora Rita Maria Payan Martins Pinto Carreira
Coordenador do Curso de Medicina Veterinária - ICBAS-UP, Prof. Doutor António Rocha
Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária - U.Évora, Prof^a Doutora Ludovina Neto Padre
Coordenador do Curso de Medicina Veterinária - EUVG, Prof. Doutor Humberto Rocha
Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária - ULHT, Prof^a Doutora Laurentina Pedroso

Comissão Organizadora

Dr. Carlos Godinho
Dr. José Pimentel de Carvalho
Doutora Yolanda Vaz
Dr. António Simões Monteiro
Doutora Ana Cristina Lobo Vilela
Dr. José Oom Vale Henriques
Doutor João Ramalho Ribeiro

Comissão Científica

Doutora Cristina Lobo Vilela, Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (SPCV)
Doutora Yolanda Vaz, Editor da Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV)
Doutor Fernando Afonso, Aquacultura - Faculdade de Medicina Veterinária (FMV)
Doutor Virgílio Almeida, Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva (SPEMVP)
Doutor Jordi Casal, Sociedade Espanhola de Epidemiologia Veterinária (SEEV)
Doutora Maria dos Anjos Pires, Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (SPPA)
Dr. António Matos, Sociedade Científica de Suinicultura (SCS)
Dr. João Rebelo Cotta, Secção Portuguesa da Associação Mundial de Ciência Avícola (SPAMCA)
Dr. Joaquim Vieira Lopes, Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia (APMVEAC)
Dr. José Nuncio Fragoso, Associação dos Médicos Veterinários de Equinos (AMVE)
Doutor Luís Telo da Gama, Sociedade Portuguesa de Recursos Genéticos (SPRGA)
Doutor Ramiro Mascarenhas, Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal (SPRA)
Doutor João Cannas da Silva, Associação Portuguesa de Buiatria (ABP)
Doutor José Santos Silva, Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia (SPOC)

Apoios Institucionais

Ordem dos Médicos Veterinários
INRB INIA/FonteBoa
Direcção Geral de Veterinária
Câmara Municipal de Santarém
Faculdade de Medicina Veterinária - UTL

Patrocínios

CEVA - SAÚDE ANIMAL
Merial PORTUGUESA - SAÚDE ANIMAL
LABORATÓRIOS PFIZER

ALLTECH PORTUGAL
ARBUSET
BAYER PORTUGAL SA - DIVISÃO ANIMAL
IAPSA PORTUGUESA PECUÁRIA
VETLIMA
VÉTOQUINOL UNIPESSOAL

Apoios

ATRAL CIPAN
AGROQUISA
BIOCONSULTING
ELANCO
TNA - TECNOLOGIA E NUTRIÇÃO ANIMAL LDA
VALORMED

Secretariado

Anabela Almeida - Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias SPCV
R. Gomes Freire, 1169-014 Lisboa, Tel + 351 21 358 0222, Fax + 351 21 358 0221
congresso@spcvet.pt
www.spcvet.pt/Congresso2008

Editorial

A Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (SPCV) conta com uma tradição centenária de servir, apoiar e incentivar todos quantos se dedicam a esta área de conhecimento. Na sequência de uma tradição já alicerçada, organiza agora, em colaboração com o INRB - INIA/Fonte Boa, o Congresso de Ciências Veterinárias 2008, que engloba o IV Congresso da SPCV e o I Congresso Ibérico de Epidemiologia Veterinária, que terá lugar na Fonte Boa, Vale de Santarém, de 27 a 29 de Novembro de 2008. Esta organização assume assim um carácter internacional que irá contribuir para uma maior projecção do evento científico.

Para a realização deste congresso tem sido fundamental a colaboração das principais organizações profissionais e associativas da classe médico-veterinária, nomeadamente: o INRB - INIA/Fonte Boa, a Ordem dos Médicos Veterinários, as Instituições de Ensino de Medicina Veterinária, o Sindicato Nacional dos Médicos Veterinários. De salientar as diferentes Sociedades sectoriais de Animais de Companhia, Avicultura, Buiatria, Equinos, Epidemiologia, Ovinotecnia e Caprinotecnia, Patologia, Recursos Genéticos, Reprodução Animal e Suinicultura, responsáveis pelos programas das respectivas áreas. O I Congresso Ibérico de Epidemiologia Veterinária foi co-organizado pelas sociedades Portuguesa e Espanhola de epidemiologia, num esforço conjunto que espelha a estreita colaboração entre ambas. A SPCV quer deixar claramente expressa a sua gratidão pelo apoio e incentivo que recebeu destas organizações, sem os quais não teria sido possível a realização de um evento científico com o amplo espectro que caracteriza este Congresso.

O Congresso de Ciências Veterinárias 2008, para além de representar uma oportunidade de divulgação a nível nacional e internacional do vasto trabalho desenvolvido no domínio das Ciências Veterinárias, constitui um importante fórum de discussão e partilha de experiências entre todos quantos desenvolvem a sua actividade profissional nesta área de conhecimento.

A SPCV deseja que o Congresso de Ciências Veterinárias 2008 cumpra com as expectativas de todos quantos contribuíram para a sua organização e de todos quantos nele participam, numa clara demonstração da dinâmica dos Profissionais, Técnicos, Docentes e Investigadores desta área do conhecimento que, embora nem sempre com os apoios desejados, mantém uma capacidade de concretização de objectivos capaz de levar por diante as fronteiras do conhecimento.

A Comissão Organizadora

Índice Geral

Comissão de Honra	iii
Comissão Organizadora	iii
Comissão Científica	iii
Apoios Institucionais.....	iv
Patrocínios.....	iv
Secretariado.....	iv
Editorial	v
SESSÕES PLENÁRIAS	1
COMUNICAÇÕES ORAIS	9
Suinicultura	10
Sustentabilidade e bem-estar em aquacultura	16
Equinos	20
Reprodução	23
Microbiologia	33
Qualidade e segurança alimentar	39
Epidemiologia e saúde pública.....	49
Animais de companhia	89
Buiatria	95
Outros assuntos de interesse em ciências veterinárias	102
POSTERS	107
Índice de Comunicações.....	248

SESSÕES PLENÁRIAS

EFSA: actividades de cooperação científica com os Estados Membros

Sérgio Potier Rodeia

Unidade de Cooperação Científica, Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, Parma

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) visa promover actividades de carácter científico na área da segurança alimentar em função das prioridades sentidas a nível europeu e da forma mais apropriada. Tal objectivo apenas pode ser alcançado se a excelência científica existente a nível europeu puder ser reunida e devidamente coordenada. Por conseguinte, a cooperação científica entre Estados Membros e EFSA afigura-se essencial para: afectar os recursos disponíveis face às prioridades definidas; uma melhor coordenação dos programas nacionais e europeus em matéria de avaliação e comunicação de riscos, prevenindo desse modo duplicação de actividades equivalentes; a identificação e análise precoce de riscos emergentes; uma maior coerência nas actividades de avaliação e comunicação de riscos. A importância das actividades de cooperação científica entre a EFSA e os Estados Membros encontra-se formalmente expressa no Artigo 36 do Regulamento (CE) No. 178/2002, de 28 de Janeiro.

O mecanismo formal para a promoção de actividades de cooperação científica com os Estados Membros ocorre por via do Fórum Consultivo da EFSA. Em 2006, os membros do Fórum Consultivo assinaram uma “Declaração de Intenções”, bem como um documento estratégico para o reforço da cooperação e intercâmbio de informação científica nas áreas da avaliação e comunicação de riscos a nível europeu. Em 2007, O Fórum Consultivo e o Comité Científico da EFSA criam o Grupo Promotor de Cooperação Científica, cujo principal objectivo é materializar a estratégia acordada em projectos tangíveis e concretos. Estão actualmente em curso um conjunto de projectos que traduzem claramente o sucesso na implementação desta estratégia de cooperação científica.

Uma forte cooperação científica é igualmente fundamental para um sistema europeu de segurança alimentar eficiente, e, por conseguinte, para uma maior e melhor protecção dos consumidores europeu, e consequentemente para o aumento da sua confiança nos sistemas vigentes. A EFSA reúne regularmente com os Estados Membros para discutir o reforço desta cooperação científica, identificando áreas específicas onde a avaliação de riscos é mais premente.

No seguimento da implementação de estratégias de cooperação científica ao abrigo do Artigo 36 supracitado, o Conselho de Administração da EFSA adoptou uma lista de organizações, públicas e privadas, propostas pelos Estados Membros, que podem assistir a EFSA em matéria da recolha de dados, trabalho preparatório de opiniões científicas e suporte técnico noutras áreas, como por exemplo em riscos emergentes. Estas organizações podem assim formalmente candidatar-se a concursos que a EFSA vem regularmente publicando nas suas páginas oficiais.

A EFSA estabeleceu recentemente uma rede de “Pontos Focais”, que actua como elemento de interface operacional entre a EFSA e as agências nacionais congéneres da EFSA. O objectivo principal dos Pontos Focais é dar apoio aos respectivos membros do Fórum Consultivo. Tal tarefa inclui assegurar o intercâmbio e a partilha de informação científica entre os Estados Membros e a EFSA, estabelecer redes nacionais de organismos / instituições para recolha e divulgação de tal informação e a promoção da actual base de dados de peritos da EFSA.

[EFSA: Scientific cooperation activities with Member States]

EFSA aims to deliver the best science at the right time and in the most appropriate manner. This can only be achieved through effective pooling of the wide scientific excellence available in Europe. As a result, scientific cooperation is critical to: appropriate allocation of resources against priorities; better co-ordination of work programmes, thereby avoiding duplication of activities; early identification and analysis of emerging risks; and finally, increased coherence in scientific risk assessment and communications. The importance of scientific cooperation is also formally described in Article 36 of EFSA’s Founding Regulation.

At EFSA, the formalized mechanism for this type of work is through EFSA’s Advisory Forum. In 2006, Advisory Forum members signed a ‘Declaration of Intent’ and approved a formal strategic document to strengthen scientific cooperation and information exchange on risk assessment and risk communication in Europe. Projects associated with this declaration and subsequent strategy are now being developed and implemented. In 2007, a Steering Group on Cooperation was established as the interface between the Advisory Forum and EFSA’s Scientific Committee to help steer the implementation of this strategy into tangible projects.

Strong cooperation between Member States and EFSA is also fundamental to the overall success and effectiveness of the European food safety system, and ultimately to increased consumer protection and confidence. EFSA meets regularly with Member States to discuss strengthening scientific co-operation in risk assessment of specific food safety issues.

In line with Article 36 of EFSA's founding regulation, EFSA's Management Board approved a list of both private and public organizations based on proposals from Member States able to assist EFSA in some of its tasks including data collection, preparatory work for scientific opinions and technical support in other areas such as emerging issues. These organizations are able to formally apply for calls for proposals issued by EFSA.

EFSA has also initiated Focal Points in the Member States, who act as an interface between EFSA and the different national food safety authorities, research institutes, consumers and other EFSA-related stakeholders. The key objective for Focal Points is to support their Advisory Forum members. This includes ensuring the exchange of scientific information between EFSA and the Member States, building networks, and raising EFSA's scientific visibility. Moreover, Focal Points assist in populating a common database of external scientific experts.

Emergent infectious diseases - what do we know?

Mo Salman

Animal Population Health Institute - College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences - Colorado State University, EUA

The main aim of this presentation is to address the current changes in disease ecology that have led to emerging and re-emerging diseases. The epidemiological triad of host, agent, and environment and their related interactive factors will be discussed in respect to these diseases. Preventive measures and preparedness plans will be presented with the emphasis on the value of applied and translational research. Demonstrations with real examples will be presented during the 30 minutes of this session.

[Doenças infecciosas emergentes: o que sabemos?]

O principal objectivo desta comunicação é abordar as actuais alterações na ecologia das doenças que conduziram à emergência e à re-emergência de certas doenças. A tríade epidemiológica: hospedeiro, agente e ambiente, e as suas interacções serão discutidas relativamente às doenças emergentes e re-emergentes. As medidas preventivas e os planos de contingência serão também apresentados, enfatizando a importância da investigação aplicada e de translação. Exemplos reais serão invocados durante a sessão.

Produtos tradicionais – Qualificação e sobrevivência

Ana Soeiro™

Qualificação de Produtos Tradicionais; qualificanasoeiro@gmail.com

Portugal possui um enorme património de produtos agrícolas e agro-alimentares com características decorrentes da sua origem e do seu modo de produção, baseado em hábitos ancestrais e em métodos locais, leais e constantes. Proteger estas origens e estas tradições é proteger o futuro, dando-lhe perspectivas... qualificadas

Desde sempre que certos produtos agrícolas e certos géneros alimentícios começaram a ser tratados pelos nomes das terras onde eram produzidos ou transformados. Gregos e romanos já chamavam vinhos, azeites, queijos, pão, azeitonas, pastas de peixe e outros produtos pelos nomes das suas regiões de origem, diferenciando-lhes a "qualidade". Terão começado assim a usar-se as primeiras denominações de origem (DO) e indicações geográficas (IG): nomes geográficos usados como forma de reconhecimento da qualidade diferenciada, decorrente dos territórios de origem e dos modos e hábitos locais, leais e constantes.

Portugal terá sido o 1º país da Europa a instituir legalmente, no séc. XVIII, o sistema de protecção de uma denominação de origem, associada naturalmente a uma região delimitada de produção e a uma caracterização do produto e das suas regras de produção.

Na Europa existe legislação que permite qualificar muitos produtos agro-alimentares, através da protecção das suas IGs e DOs. E existem porque a Europa percebeu que a protecção de um nome geográfico é uma importantíssima alavanca de desenvolvimento rural, já que permite diversificar a produção agrícola, promover produtos de zonas desfavorecidas, melhorar os rendimentos dos produtores, fixar as populações, respeitar os consumidores e privilegiar a qualidade em detrimento da quantidade.

Proteger as IGs e as DOs é promover as zonas de produção, impedindo a sua desertificação, potenciando os recursos existentes, gerando postos de trabalho qualificados, respeitando raças e variedades autóctones, melhorando a fertilidade dos solos, preservando as condições ambientais naturais, respeitando os ecossistemas, a biodiversidade e o património genético e garantindo a sobrevivência das gerações actuais e futuras.

Melhorando o sistema de registo, qualificando os nomes geográficos e as menções tradicionais, valorizando a certificação dos produtos e impondo o uso dos logotipos comunitários, a Europa parece valorizar cada vez mais as suas produções tradicionais, diferenciando-as e permitindo que demonstrem o valor dos territórios e das populações. No entanto, não é ainda suficiente. Existe uma larga margem de produtos, de produtores e de outros operadores cuja sobrevivência depende da Qualificação e inerente valorização dos seus produtos, ligados a sistemas tradicionais, ecológicos, adaptados às circunstâncias e, com tal, muito competitivos!

[Traditional products - qualification and survival]

Portugal possesses an enormous patrimony of agricultural products and foodstuffs with characteristics coming from its origin and or its way of production, based on old traditions and local, loyal and constant methods. Protect these origins and this tradition is to protect the future, giving qualified perspective to people...

Since a long time ago that certain agricultural products and certain foodstuffs had started to be treated by the names of lands where they were produced or transformed. Greeks and Romans already called wines, olives and olive oils, cheeses, fish and meat products, fruits, bread and a lot of other products for the names of its regions of origin, allowing them to differentiate its "quality".

They will thus have started to use the first designations of origin (DO) and geographical indications (GI): geographic names used as form of recognition of the differentiated quality, coming from certain territories but also with from local, loyal and constant methods and habits.

Portugal will have been the first European country to institute by law, in the 18th century, the system of protection of designations of origin, associated of course to a delimited region of production and a characterization of the product and its rules of production.

In Europe, we have now laws in order to qualify a lot of agri-food products, using the protection of GIs and DOs. And those systems exists because Europe understood that the protection of a geographical name is a very important tool to rural development and rural sustainability, since it allows to diversify the agricultural production, to promote products from less favoured regions, to improve producers' incomes, to avoid desertification and, at the same time, to respect consumers that privilege "quality" instead of "quantity".

To protect a GI or a DO is to promote the production zones, to keep them alive, harnessing the existing resources, generating qualified jobs, respecting local breeds and local varieties, improving soil fertility, preserving the natural conditions and landscape, respecting ecosystems, biodiversity and genetic patrimony. In others words, assuring the survival of existing and future generations.

Improving the register system, qualifying traditional geographical or non-geographical names, granting value to the certification of the products and imposing the use of the communitarian logos, Europe seems to add each time more value to true and traditional productions, differentiating them and allowing that they demonstrate the value of countries, regions and human know how.

But, it is not enough! It still remains lot of products, a lot of producers and other operators whose survival depends on the Qualification of their goods, linked to traditional production systems, ecological, adapted to the existing circumstances and, as so, with a lot of competitiveness!

Lymphoma: a heterogeneous disease revealed by morphologic, immunologic and molecular investigation

Peter Moore

University of California, Davis, EUA

Recently, much effort has been directed at applying the World Health Organization (WHO) classification of hemopoietic and lymphoid neoplasia to canine lymphoma. It is clear from this work that there are distinctive subtypes of canine lymphoma that correspond to equivalent human entities as defined by the WHO lymphoma classification scheme. An important issue that has emerged is that lymphoma is an encompassing term for a number of discrete clinical and morphological entities with quite different outcomes. Yet treatment strategies do not take this heterogeneity into account, typically treating most lymphomas with the same or similar protocols. In applying the WHO classification scheme to canine lymphoma, it was apparent that morphological assessments required immunohistochemical stains in many instances to reinforce the diagnosis. In some instances, molecular clonality determination by lymphocyte antigen receptor gene rearrangement analysis was also needed to confidently diagnose lymphoma versus lymphoid hyperplasia. The following table lists the entities that were reproducibly recognized by non-specialist veterinary pathologists.

B cell neoplasms	T cell neoplasms
Diffuse large B cell lymphoma	Peripheral T cell lymphoma (unspecified)
Lymphoblastic B cell lymphoma	Lymphoblastic T cell lymphoma
Marginal zone lymphoma	T-zone lymphoma
Follicular lymphoma	Enteropathy associated T cell lymphoma
Mantle cell lymphoma	Hepatosplenic T cell lymphoma
Anaplastic large cell lymphoma	Anaplastic large cell lymphoma
Multiple myeloma	Mycosis fungoides
Plasmacytoma	Sezary syndrome
Burkitt-like lymphoma (controversial)	
T cell rich large B cell lymphoma	

To classify lymphomas by the WHO system as applied to the canine, it is important to have access to markers for immunohistochemical analysis. The following table lists the markers of value for determining cell lineages in leukocytic proliferations in dogs. These markers are suitable for use in formalin-fixed paraffin embedded tissues with appropriate antigen retrieval protocols. Markers are available for the detection of B and T cells. However, markers for the unequivocal detection of NK cells are not available, so the existence of NK cell lymphomas in dogs is not easily assessable.

Leukocyte markers of diagnostic importance to lymphoma investigation	
CD3ϵ	Signaling component of the T cell antigen receptor. Expressed by $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells. Cytoplasmic expression by NK cells is possible - especially if activated.
CD79a	Signaling component of the B cell antigen receptor. Expressed by all stages of B cell differentiation. Expression is less in plasma cells.
CD20	Surface molecule expressed at all stages of B cell differentiation except for plasma cells. CD20 plays a role in regulation of B cell activation and proliferation. CD20 is not lineage specific and has been observed uncommonly in T cell lymphomas. Caution is advised in interpretation of diffuse cytoplasmic expression, which can occur in several cell types.
Pax5	Transcription factor essential for maintenance of B cell differentiation. Useful B cell marker.
MUM1/IRF4	Transcription factor essential for plasma cell differentiation. Useful plasma cell marker.

CD11d	α D subunit of β 2 integrin (CD18) family. Expressed by macrophages and T cells in hemopoietic environments especially splenic red pulp. Bone marrow and lymph node medullary sinus also macrophages express CD11d. CD11d is consistently expressed in diseases emanating from splenic red pulp (LGL form of chronic lymphocytic leukemia, hepatosplenic lymphoma and hemophagocytic histiocytic sarcoma).
CD18	β subunit of the β 2 integrin family of leukocyte adhesion molecules. Expressed as a heterodimer of CD11a, CD11b, CD11c or CD11d with CD18. Leukocytes express at least one form of the heterodimer. Hence CD18 is expressed on all leukocytes - the expression level on myeloid cells is especially high compared to normal lymphocytes. CD18 has been used as a marker of histiocytes, but this is dependent upon exclusion of lymphocyte differentiation by the use of other markers (CD3 and CD79a).
CD45	Surface molecule expressed by all leukocytes - formerly known as "leukocyte common antigen". Antibodies to CD45 bind to the extracellular domain outside of the 3 variably splice exons (A, B, and C).
CD45RA	Splice variant of CD45 in which the A exon is present. Expressed by B cells and naïve T cells. Not typically expressed by histiocytes.
c-Kit	Surface molecule and member of the receptor tyrosine kinase family (type III). Expressed by most hemopoietic progenitor cells and by mast cells. Expression level is high in high grade mast cell tumors.
E-cadherin	Adhesion molecule expressed by epithelia and by some leukocytes. Especially useful in cutaneous round cell tumors to identify Langerhans cells indicative of cutaneous histiocytoma.

Once immunohistochemical stains are performed, it may also be necessary to run molecular clonality analyses to confirm lymphoma. This is particularly so in inflamed lymphomas, or lymphomas arising in the context of inflammation.

Lymphocyte antigen receptor gene rearrangement – for lymphoma diagnosis: During T cell development in the thymus, T cells rearrange their antigen receptor genes *TCRA*, *TCRB*, *TCRG* and *TCRD*, and in the process create 2 lineages of T cells, $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. The majority of $\alpha\beta$ T cells rearrange *TCRG* prior to the rearrangement of *TCRA* and *TCRB*. Hence, *TCRG* gene rearrangement occurs in the majority of T cells regardless of surface TCR $\alpha\beta$ or TCR $\gamma\delta$ expression. The protein product of *TCRG* is TCR γ , which contains a variable (V) domain and a constant (C) domain. The V domain is encoded by 2 segments of DNA, the variable and joining (J) segments. Although multiple V and J segments exist for *TCRG*, they are relatively limited in number and diversity by comparison with *TCRA* and *TCRB*. Gene rearrangement during T cell development in the thymus leads to random joining of a V segment to a J segment, leading to the formation of the complete V domain exon. The diversification of the *TCRG* repertoire is enhanced by the creation of P nucleotides, and the random insertion of N nucleotides by terminal transferase between the V and J segments. This creates the highly diverse third hypervariable region of the V domain, also known as the complementarity determining region 3 (CDR3). The CDR3 region is at the center of the antigen binding site and hence is the major contributor to antigen specificity. The preferred target for determination of clonality in T lymphocyte populations of both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ lineages is PCR amplification of the CDR3 region of *TCRG*.

B cells rearrange their antigen receptor genes in the bone marrow during B cell development. B cells re-arrange multiple V, J and D immunoglobulin (Ig) gene segments, initially in their heavy chain Ig genes (VHDJ), and later in either κ or λ light chain Ig genes (VLJ). This process of somatic recombination was first described for Ig genes and resembles the description of the process already outlined for T cells. A further property of Ig genes is their propensity to undergo V region somatic hypermutation, particularly during secondary antibody responses in germinal centers of follicles in peripheral lymphoid organs. Antibodies of high affinity are produced in secondary lymphoid responses (affinity maturation) by this mechanism. The most commonly used target for determination of clonality in B lymphocyte populations is the *IGH* locus due to the extensive diversity of the CDR3 region and the conservation of *IGH* V and J segments, which facilitate PCR primer design. One pitfall of using *IGH* for molecular clonality determination is the extensive V segment gene mutation that occurs in post germinal center B cells can modify primer binding sites in the V segment. This can lead to false negative PCR results and reduced sensitivity of *IGH* as a molecular target for clonality determination in B cells.

Lymphocyte antigen receptor clonality determination is a valuable adjunct to morphologic and immunophenotypic assessment of lymphoproliferative disorders. It is not a primary diagnostic assay, and it cannot replace morphologic and immunophenotypic assessment. Lymphocyte antigen receptor gene rearrangement can be promiscuous; both *TCRG* and *IGH* rearrangement can be observed in lymphomas of a single immunophenotype (B or T cell). Also,

lymphocyte antigen receptor gene rearrangement has been observed in non-lymphoid leukocytic malignancy, such as acute myeloid leukemia.

Molecular clonality determination is not needed to establish a diagnosis in most lymphoid proliferations in which architectural effacement of organized lymphoid tissue, cytological features of lymphocytes, and immunophenotyping are sufficient. Molecular clonality determination is indicated when morphological features of lymphocytes and immunophenotyping are inconclusive. These conditions are most often met in some lymphoid proliferations in gut and skin, or in organized lymphoid tissue when architecture is largely intact (eg early marginal zone and T-zone lymphoid proliferations). Molecular clonality determination is also valuable in the assessment of the clonal relationship of lymphoid proliferations in separate sites. In this instance, it is possible to distinguish relapse from a second malignancy. The use of clonotypic primers (specific for a particular CDR3 sequence) can facilitate this investigation. However, development of clonotypic primers is expensive and not always possible based on the CDR3 sequence.

Conclusion: It is possible to distinguish distinctive subtypes of lymphoma by careful assessment of clinical and morphological data, coupled with immunohistochemical and molecular clonality analysis as adjunctive assessments. Some of these lymphomas are notably indolent in behavior; these include follicular lymphoma, marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma and T-zone lymphoma. High grade lymphoma protocols are not appropriate for the treatment of these indolent lymphomas, since the proliferative fraction is very low. Increased awareness of distinctive types of lymphoma with human equivalents, has made it possible to search for underlying molecular defects based on data already available for human lymphomas. Recently published results for canine lymphoblastic T cell lymphoma underscore the likely success of this approach going forward.

References:

- 1 Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M: From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol* 137: 949-952, 2001
- 2 Feldman AL, Dogan A: Diagnostic uses of Pax5 immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol* 14: 323-334, 2007
- 3 Fosmire SP, Thomas R, Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE, Getzy DM, Smith TL, Gardner LA, Ritt MG, Bell JS, Freeman KP, Greenfield BE, Lana SE, Kisseberth WC, Helfand SC, Cutter GR, Breen M, Modiano JF: Inactivation of the p16 cyclin-dependent kinase inhibitor in high-grade canine non-Hodgkin's T-cell lymphoma. *Vet Pathol* 44: 467-478, 2007
- 4 Fry MM, Vernau W, Pesavento PA, Bromel C, Moore PF: Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Vet Pathol* 40: 556-562, 2003
- 5 Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *In: World Health Organization Classification of Tumours*, eds. Kleihues PSobin LH. IARC Press, Lyon, 2001
- 6 Jensen KC, Higgins JP, Montgomery K, Kaygusuz G, van de Rijn M, Natkunam Y: The utility of PAX5 immunohistochemistry in the diagnosis of undifferentiated malignant neoplasms. *Mod Pathol* 20: 871-877, 2007
- 7 Moore PF, Olivry T: Cutaneous lymphomas in companion animals. *Clinics in Dermatology* 12: 499-505, 1994
- 8 Moore PF, Olivry T, Naydan D: Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. *Am J Pathol* 144: 421-429, 1994
- 9 Platz SJ, Breuer W, Pflieger S, Minkus G, Hermanns W: Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. *Vet Pathol* 36: 23-27, 1999
- 10 Ponce F, Magnol JP, Ledieu D, Marchal T, Turinelli V, Chalvet-Monfray K, Fournel-Fleury C: Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J* 167: 158-166, 2004
- 11 Ramos-Vara JA, Miller MA, Valli VE: Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. *Vet Pathol* 44: 875-884, 2007
- 12 Schrenzel M, Naydan D, Moore P: Leukocyte antigen expression in cutaneous plasmacytomas in dogs. *Veterinary Dermatology* 9: 33-41, 1998
- 13 Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF: Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals, Second Series ed., vol. VIII, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 2002
- 14 Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF: Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol* 43: 241-256, 2006
- 15 van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurink E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17: 2257-2317, 2003.

COMUNICAÇÕES ORAIS

Suinicultura

Comunicação por convite

Circovirose Suína - Resultados de vacinação em Portugal

Jorge, José Miguel Lopes

Merial Portuguesa - Saúde Animal, Lda

O Circovírus Porcino tipo 2 (PCV2) foi associado em 1998 ao complexo das Doenças por Circovírus Porcino (PCVD), caracterizado pela diversidade sintomática, constituindo o Síndrome Multissistémico Debilitante do Pós Desmame (PMWS/SMDP) a forma economicamente mais significativa. Dentro das PVCD são referenciadas o Síndrome Dermatite / Nefropatia (PDNS), a Pneumonia Necrosante Proliferativa (PNP), a Pneumonia pós-desmame (PRRS), o Síndrome Mortalidade Aborto (SAMS), sendo as PCVD cada vez mais associadas ao complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC) e a perturbações reprodutivas.

O PCV2 foi descrito como um vírus “imuno comprometedor” devido à sua acção sobre as células dendríticas, nas quais vai diminuir a capacidade de processamento dos antígenos, levando a uma redução da capacidade de estimulação/desenvolvimento do sistema imunitário e consequentemente a uma menor capacidade de resposta a agentes agressores.

A utilização da primeira vacina desenvolvida contra o PCV2 – Circovac® – iniciou-se em 2004 (autorização especial de utilização em França e na Alemanha), tendo obtido até à presente data resultados significativos na redução da mortalidade, melhoria dos desempenhos de crescimento, eficiência alimentar e homogeneidade, na diminuição da frequência de tratamentos antimicrobianos e na melhoria do desempenho reprodutivo (diminuição da taxa de retorno em cio, diminuição da taxa da abortos, aumento dos nados vivos/ninhada).

O primeiro diagnóstico de PMWS em Portugal ocorreu em 1999 e a Circovac® foi utilizada pela primeira vez em Setembro de 2007.

Do conjunto de 33 explorações (15.765 reprodutoras) que implementaram a vacinação entre 20/09/2007 e 27/02/2008, 30% vacinaram exclusivamente reprodutoras e 70% vacinaram simultaneamente reprodutoras e leitões, sendo que a vacinação dos leitões ocorreu até serem desmamados leitões nascidos de reprodutoras com primovacinação de Circovac® completa.

Do inquérito efectuado a Médicos Veterinários prescritores para avaliar os resultados da implementação da vacinação contra o PCV2, foram obtidos dados de 10 explorações (5.291 reprodutoras), os quais evidenciaram melhoria das taxas de mortalidade (10/10), desempenho de crescimento (3/3) e no desempenho reprodutivo (3/4).

[Porcine Circovirus - Vaccination results in Portugal]

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) was associated in 1998 to the Porcine Circovirus Diseases complex (PCVD), characterized by symptomatic diversity, being the Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS/SMDP) the more economically significant form. Inside of PVCD complex, several diseases are referred - the Dermatitis Nephropathy Syndrome (PDNS), the Proliferative Necrotizing Pneumonia (PNP), the Post Weaning Pneumonia (PRRS), the Sow Abortion Mortality Syndrome (SAMS) - being PCVD more and more associated to the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) and to reproductive disorders.

PCV2 was described as a virus “imuno compromising” due to his action on the dendritic cells, reducing antigen processing capacity, leading to the reduction of the immune system stimulation/development capacity and consequently to a smaller answer to aggressor agents.

The use of the first vaccine developed against PCV2 – Circovac® - began in 2004 (special authorization of use in France and in Germany), having obtained to the present date significant results in the reduction of mortality, improvement of growth performance, alimentary efficiency and homogeneity, decrease of antimicrobial treatments frequency and in the improvement of reproductive performance (decrease of return to heat rate, decrease of abortions rate, increase of live born/parity).

The first diagnosis of PMWS in Portugal happened in 1999 and Circovac® was used for the first time in September of 2007.

In 33 explorations (15.765 sows) that implemented the vaccination between 20/09/2007 and 27/02/2008, 30% vaccinated exclusively sows and gilts and 70% vaccinated simultaneously sows, gilts and piglets. Piglets vaccination was performed until piglets born from sows that accomplish Circovac® primo vaccination were weaned.

An inquiry was made to Veterinary Doctors, in order to evaluate the results of vaccination against PCV2. The data obtained from 10 farms (5.291 sows) show improvement of the mortality rates (10/10), growth performance (3/3) and reproductive performance (3/4).

Estudo de prevalência de ileíte enteroproliferativa em Portugal

Mendonça, Camilo

Vetlima, Lisboa

Introdução e objectivos: A Enteropatia Proliferativa dos suínos é causada pela *Lawsonia intracellularis* e está presente na suinicultura intensiva por todo o mundo¹. Esta patologia, vulgarmente descrita como ileíte, manifesta-se de duas formas: aguda (clínica) – com diarreia hemorrágica fatal, tipicamente descrita em porcos no final da engorda ou nulíparas recentemente introduzidas na exploração²; e crónica (sub-clínica) – diarreia ligeira, perda de peso, heterogeneidade de lotes ao abate, ocorrendo durante toda a fase de engorda. Este estudo teve como objectivo traçar o perfil sorológico para a *Lawsonia intracellularis* nas explorações portuguesas, tendo uma utilidade na avaliação da eficácia dos métodos de controlo desta doença no passado, presente e futuro.

Material e métodos: Foram objecto de amostragem 53 explorações suinícolas de vários pontos de Portugal (Entre-Douro-e-Minho, Beira Litoral, Beira Interior, Estremadura, Alentejo). O critério de amostragem das explorações teve como objectivo ser proporcional ao nº de explorações de cada região. A duração do estudo foi de dois anos (2006 a 2008). Foram recolhidas 18 amostras de sangue de cada exploração: porcos de 15 semanas (8 amostras), porcos de 18 semanas (6 amostras), porcos de 24 semanas (4 amostras). Este protocolo teve como base uma tabela de seroprevalência da doença, em que, à medida que os animais caminham para o final da engorda, a prevalência aumenta. Foi utilizado um Kit ELISA de bloqueio (97% sensibilidade; 98% especificidade), recentemente desenvolvido pela Bioscreen GmbH (Alemanha), para detecção dos anticorpos para a *Lawsonia intracellularis*. Os resultados apresentaram valores ELISA que se consideram: < 20 – negativo; 20-30 – duvidoso; > 30 – positivo.

Resultados: A prevalência total detectada em Portugal da ileíte enteroproliferativa em suínos de engorda foi de 94%. Segmentando por idade, a prevalência de ileíte foi de: 15 semanas - 75%; 18 semanas – 87%; 24 semanas – 98 %. Podemos observar que a seroconversão ocorre, em pelo menos 75% dos casos, antes das 15 semanas de vida dos animais. Este facto, por sua vez, indica que a infecção ocorrerá, na maioria dos casos, antes das 12 semanas de vida (há uma duração de 3 semanas desde a infecção até à seroconversão). Outro resultado visível é a variação geográfica da prevalência da doença, sendo que a região de Leiria e o norte de Portugal apresentam níveis mais elevados de ileíte enteroproliferativa. Se nos reportarmos à prevalência na amostragem do total dos animais, esta baixa para 58%. Ou seja, 1 em cada 2 animais, dentro de cada exploração, está contaminado.

Discussão: O nível de prevalência detectado torna praticamente endémica esta doença nas engordas suinícolas (>90%). O facto de haver um elevado nº de suínos infectado por exploração revela o alto nível de contágio da doença (>50%).

Em relação à epidemiologia, e dado que a patologia é de elevada contagiosidade, verificou-se uma maior prevalência em zonas de maior densidade da população suína (ex. Leiria). Outro dado epidemiológico importante tem a ver com a alta prevalência nas explorações do norte do país. Este facto poderá ser atribuído ao menor rigor no maneo, higiene e qualidade das instalações nesta região, o que leva também ao aumento de risco de contágio da doença³. Dado que a ileíte já assola a suinicultura há mais de duas décadas, este estudo vem demonstrar que não tem havido uma abordagem eficaz no seu controlo em Portugal. A situação piorou ainda mais desde a retirada dos promotores de crescimento da ração em 2006⁴. O paradigma da vacinação em leitões é cada vez mais uma realidade irrevogável⁵, dado que a antibioterapia que tem sido utilizada nas engordas não tem baixado a prevalência da doença^{6,7}. Outra questão de relevo é o facto dos sintomas da ileíte serem sobretudo subclínicos, ou seja, a diminuição do ganho médio diário de peso dos animais, o aumento do índice de conversão e a heterogeneidade do peso dos suínos levam a grandes perdas económicas^{8,9}.

Agradecimentos: A todos os colegas e suinicultores que colaboraram na recolha de amostras e disponibilizaram os dados das explorações e ao LMV (Lab. Med.Vet.) pelo serviço analítico prestado de uma forma profissional e solícita.

Bibliografia: 1Kroll J. *et al.*, 2004 18th IPVS Proceedings; 2Jacobson M., 2008 20th IPVS Proceedings; 3Labuscagne A., 2008 20th IPVS Proceedings; 4Connor *et al.*, 2004 18th IPVS Proceedings; 5Rigat J., Font J., 2008 20th IPVS Proceedings; 6Hardge, 2004 18th IPVS Proceedings; 7Nielsen E., 2008 20th IPVS Proceedings; 8Morel A., 2008 20th IPVS Proceedings; 9Adam M., 2008 20th IPVS Proceedings.

Carências nutricionais durante o parto

Barreiros, Pedro

SCA Ibérica; pbarreiros@scaiberica.com

Tem-se vindo a constatar que o melhoramento genético realizado em reprodutoras pelas empresas da especialidade, tem sido deveras importante, nomeadamente no que respeita à sua prolificidade.

Todavia, esse aumento de prolificidade tem sido acompanhado por um aumento do nº de leitões nascidos mortos e também por um aumento da % de mortalidade nos primeiros cinco dias de vida dos leitões.

Esta nova situação deve-se basicamente a partos distócicos devido a um esgotamento físico a que as reprodutoras estão sujeitas, associados a riscos mais elevados de hipóxia nos leitões. Este aumento da % de partos distócicos deve-se a um maior nº de leitões nascidos associado a deficiente condição física das reprodutoras em gestação e más condições de alojamento.

Existem soluções nutricionais para minimizar este problema, que passam pela utilização de óleo de peixe, pelo aumento do Metabolismo Energético do leitão através da utilização de triglicéridos de cadeia curta e pelo controle do Balanço Electrolítico do alimento de gestação de forma a controlar a hipocalcémia das reprodutoras. De facto a solução é fazer com que a reprodutora ingira níveis mais altos de energia e micronutrientes de forma a reduzir a fadiga e melhorar a contração muscular (evitar a hipocalcémia), e reduzindo o “stress oxidativo”.

A nível do Research and Innovation Centre do grupo Provimi foi desenvolvido um produto denominado PartuAid, que é uma mistura de minerais, vitaminas, antioxidantes naturais ligados a uma matriz energética que, prevenindo a fadiga muscular (redução do tempo de trabalho de parto), consegue diminuir o nº de leitões nascidos mortos bem como a mortalidade neo-natal (0 aos 5 dias de vida) e aumentar o consumo de ração por parte da reprodutora.

Este investimento facilmente atinge um retorno de 5:1, após a realização de ensaios experimentais a nível mundial.

[Nutrition needs during farrow]

In recent years the genetic improvements made by the specialist breeding companies in swine reproductive performance have been highly significant, particularly with respect to prolificacy.

However, this increase in prolificacy has been accompanied by an increase in the number of still born piglets and also an increase in piglet mortality in the first five days of life.

A reason for this increase in mortality can be accounted for by the increased effort required by the sow to give birth to these larger litters. This results in sows becoming fatigued during farrowing and results in them interrupting the birth process. An abnormally long and difficult birth is known as dystocia. An interruption in the birth process increases the risk of piglets being oxygen deprived which either results in them being born dead or born alive but weak due to their metabolic state being compromised.

There are potential nutritional solutions which have been investigated to help reduce this problem, for example the use of fish oil in the sow diets, administering medium chain triglycerides to new born piglets or manipulation of sow electrolyte balance. The level of success with these strategies is variable.

An alternative nutritional solution to the problem, ParturAid has been developed by the Research and Innovation Centre of the Provimi Group. Based on “sports drink” concepts, ParturAid is a nutritional supplement which contains a blend of minerals, vitamins and natural antioxidants on a high energy carrier. ParturAid has been designed to be fed to sows in the pre-farrowing period to help reduce the onset of fatigue and therefore reduce the duration of farrowing. This helps to reduce the risk of piglets being deprived of oxygen and therefore the number of stillbirths and neonatal mortality is reduced. In addition, it has also been observed in trials that sow feed intake post farrowing is improved as well as piglet pre-weaning growth performance.

Trials carried out on a global basis have shown that the use of ParturAid can result in a 5:1 return on investment.

Utilização de hepatoprotectores em suinicultura

Folque, Pedro

Eurocereal S.A., Estrada da Avessada, 2665-290 Malveira, Portugal; pedro-folque@eurocereal.pt

O fígado é um elemento fundamental do organismo animal. Intermediário entre o sistema digestivo e os restantes órgãos, desempenha um papel plurifuncional (metabolizador, filtrador, regulador, protector, ...), através de um variado número de funções: metabólicas, hormonais, biliares, uréticas, antigénicas, vitamínicas, hematológicas, ...

As suas funções metabólicas de armazenagem, regulação, metabolismo e fixação e reserva, são extremamente importantes na bioquímica dos glúcidos, lípidos e prótidos, em particular na eficiência de utilização energética e proteica dos alimentos. Substâncias ou processos, como por exemplo a esteatose hepática, podem influir em parâmetros importantes em Suinicultura como os GMD (Ganho Médio Diário), ICA (Índice Conversão Alimentar), Taxa de Músculo nas Carcaças ou na Fertilidade das porcas reprodutoras.

Os processos de degradação e de desintoxicação hepática são também fundamentais na eliminação de substâncias biológicas e xenobióticas, prejudiciais aos organismos. Estas biotransformações funcionam como um “sistema protector dos hepatócitos”, permitindo manter o seu correcto funcionamento.

Existem modificadores das funções metabólicas, usualmente chamados de hepatoprotectores, que visam estimular as funções dos hepatócitos. Estas substâncias podem actuar a três níveis diferenciados (hepático, biliar e digestivo), com acções do tipo lipotrópicas, colaréticas, colagogas, anti-oxidantes, desintoxicantes. São exemplos destes produtos, a Betaína, a Colina, a Metionina, o Sorbitol, o Inositol, algumas Vitaminas (E, C, B6, B12), alguns Minerais (Zn, Se, S, Mg) e mais recentemente o recurso a Extractos de Plantas (Ex.: Curcuma, Alcachofra, Rabanete Negro).

Utilizados sozinhos ou em associação, estes produtos podem ajudar à manutenção/recuperação de um bom funcionamento do fígado dos animais, pelo que a sua utilização na moderna Suinicultura, com sistemas de produção cada vez mais intensivos, pode ser uma via interessante e inovadora para auxiliar à obtenção de altos níveis de produtividade.

[Use of hepatoprotectors in swine]

The liver is a fundamental element of the animal's organism. Intermediary between the digestive system and the other organs, it plays a plurifunctional role (metabolizer, depurator, regulator, protector, ...), through a varied number of functions: metabolic, hormonal, biliary, urinary, antigenic, vitaminic, hematologic, ...

Its metabolical functions of storage, regulation, metabolism, fixation and reservation are extremely important in the biochemistry of the carbohydrates, lipids and proteins, in particular in the efficiency of the energetic and proteic usage of the feed. Substances and processes that affect the liver, as in the case of hepatic esteatosis, may influence important parameters of Swine production, such as ADG (Average Daily Gain), FCR (Feed Conversion Rate), LMR (Lean Meat Rate) or Fertility of sows.

The processes of hepatic degradation and detoxication are also fundamental in the elimination of biological and xenobiotic substances, harmful to the organisms. These biotransformations work as a “protection systems of the liver hepatocytes”, allowing keeping its correct functioning.

There are modifiers of the metabolical functions, usually called hepatoprotectors, which aim to stimulate the functions of the hepatocytes. These substances may act within three different levels (hepatic, biliary and digestive), with actions like lipotropic, colaretic, cholagogues, anti-oxidant, detoxicant. Are examples of these products the Betaine, Choline, Methionine, Sorbitol, Inositol, some Vitamins (E, C, B6, B12), some Minerals (Zn, Se, S, Mg) and more recently the usage of Plant Extracts (Ex.: Curcuma, Globe Artichokes, Black Radish).

Used alone or in association, these products may help the maintenance/recovery of the good liver functioning of the animals, so that its usage in modern Swine Production, with more and more intensive systems, it may be an interesting and innovative way to help the achievement of high levels of productivity.

Recursos Genéticos Animais

Comunicação por convite

Diversidad genética y base hereditaria de los caracteres de comportamiento en la raza de lidia

Cañón, Javier

www.ucm.es/info/genetvet; jcanon@vet.ucm.es

La de lidia puede ser considerada una raza bovina relativamente antigua y, hasta cierto punto, pionera en la implantación de un esquema de selección complejo en el que los registros de fenotipos y genealógicos eran sistemáticos. Posiblemente no sería exagerado considerar a esta población como una raza de razas, una *metaraza*, con una gran diversidad entre las unidades genéticas (encastes-ganaderías) que la conforman.

En esta raza se produce un importante aislamiento reproductivo entre las poblaciones que la constituyen, por lo que en la actualidad podemos observar una gran variabilidad dentro de la raza, debido en gran parte al interés de los criadores por disponer de un patrimonio genético propio, que se mantiene durante varias generaciones en el seno familiar. Este objetivo, de alguna manera conservacionista, puede ser contrario al de obtener una mayor rentabilidad económica.

La forma en la que los ganaderos de lidia han gestionado esta raza, aplicando técnicas genéticas de forma empírica, ha hecho de la misma un gran experimento genético dando lugar a una explosión de familias, líneas o encastes, muchos de ellos en serio peligro de extinción.

La diversidad genética observada en esta raza se parece más a la que se encuentra en las razas del Medio Oriente, uno de los grandes focos de domesticación de especies animales, que a la de las razas europeas, posiblemente debido a la división en encastes. De hecho, dentro de la raza de lidia, la distancia genética entre encastes es, por término medio, casi tres veces mayor que la distancia que hay entre cualquier pareja de razas dentro del bovino europeo.

En la raza de lidia se detectó presencia de dos eventos de domesticación que se produjeron hace unos diez mil años en el *Bos taurus*, uno en Oriente Próximo (del que proceden la mayoría de las razas bovinas europeas actuales) y el otro en el Sahara Oriental.

Las relaciones genéticas entre ganaderías, visualizadas a través del árbol de relaciones genéticas, permiten trazar el origen de las mismas hasta las castas fundacionales de procedencia, corroborando de una forma muy precisa el conocimiento histórico que tenemos sobre el origen de dichas ganaderías.

Un hecho relevante en la genética de la raza de lidia es el elevado nivel relativo de heredabilidad de los principales caracteres de comportamiento utilizados como criterio de selección para la aptitud en la lidia. Este elevado nivel de variabilidad genética ha permitido modificar el comportamiento del toro bravo, adaptándolo tanto a lo largo del tiempo al tipo de lidia demandado, como en un mismo momento a los diferentes tipos de festejos tradicionales.

Diversidade genética em raças autóctones Portuguesas

Telo da Gama, L., Oliveira e Sousa, M.C., Santos Silva, M.F., Bressan, M.C., Carolino, M.I., Carolino, N., Ginja, C., Vicente, A.

Unidade de Investigação de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal Instituto Nacional de Recursos Biológicos. Fonte Boa 2005-048 Vale de Santarém; genetica.ezn@mail.telepac.pt

Apresenta-se uma revisão dos estudos de diversidade genética realizados com raças autóctones portuguesas ao longo dos últimos anos. Diversos trabalhos efectuados com marcadores neutros, abrangendo a maioria das espécies e raças de animais domésticos, permitem concluir que a diversidade genética existente é bastante elevada, sendo as diferenças entre raças muito acentuadas nos suínos e, em menor escala, nos bovinos. Alguns trabalhos recentes têm usado marcadores do mt-DNA e, em menor escala, do crY, na análise da estrutura genética das populações. Estes trabalhos têm apontado para uma influência das raças bovinas norte-africanas nas raças autóctones de Portugal. Nos últimos anos, diversos autores têm estudado marcadores genéticos com potencial utilidade na selecção, destacando-se os marcadores ligados à resistência ao scrapie nos ovinos, susceptibilidade ao stress nos suínos, qualidade da carne nos bovinos, etc. Os resultados obtidos até agora nos estudos com raças autóctones portuguesas poderão ser potencializados pelo estabelecimento e aprofundamento de colaborações com grupos de outros países, de forma a poder padronizar procedimentos e metodologias, e também fortalecer os recursos humanos, dando assim uma dimensão muito mais vasta ao trabalho realizado individualmente pelos diferentes grupos.

[Genetic diversity in Portuguese native breeds]

A review is presented of studies published over the last few years on genetic diversity in Portuguese native breeds of livestock. Several studies conducted with neutral genetic markers, covering the vast majority of livestock species and breeds, lead to the conclusion that existing levels of genetic diversity are quite high, with large genetic differences between breeds of pigs and smaller differences among cattle breeds. Some recent studies have used mt-DNA genetic markers and, not as often, crY markers, to assess the genetic structure of populations. These investigations have pointed towards an influence of north-african cattle on Portuguese native breeds. Over the last few years, several authors have studied genetic markers of potential usefulness in selection programs, especially those related to resistance to scrapie in sheep, susceptibility to stress in swine, meat quality traits in cattle, etc. The results obtained until now with Portuguese breeds could be enhanced through the establishment and strengthening of collaborations with groups from other countries, in order to standardize procedures and methodologies, as well as to reinforce human capacity, thus providing a much wider scope to the work carried out individually by the different groups.

Sustentabilidade e bem-estar em aquacultura

Comunicação livre oral

Bócio em linguado-branco (*Solea senegalensis*, kaup): a importância do manejo na produção

Ramos, P.¹, Peleteiro, M.C.², Power, D.³

1 INRB, IP - L IPIMAR, Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos. Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV-TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

3 Universidade do Algarve, FERN. Campus de Gambelas. 8005-139 Faro-Portugal

Os tumores da tiróide em peixes são raros na natureza, sendo a sua frequência superior em peixes de aquacultura, especialmente se mantidos em meios deficientes em iodo.

O linguado-branco (*Solea senegalensis*, Kaup), pelo seu elevado valor comercial, é uma espécie atractiva do ponto de vista da produção e diversificação aquícola.

Trezentos e dezassete exemplares de linguado-branco, mantidos em cativeiro, em condições naturais de luminosidade e temperatura, desenvolveram formações hiperplásicas na base dos arcos branquiais.

O estudo microscópico e da ultra-estrutura das células das lesões revelaram características associadas a células em grande actividade. Contudo, o doseamento da T3 era muito baixo. Tratou-se de uma situação de hiperplasia da tiróide associada a hipotiroidismo. As lesões observadas correspondiam a bócio multinodular.

Diversos factores podem ter contribuído para o desenvolvimento desta doença mas, através de diversos ensaios experimentais, verificou-se que i) a administração de dieta inadequada, ao interferir no crescimento, teve um papel indirecto no desenvolvimento das alterações tecidulares observadas e ii) os níveis baixos de iodo na água do circuito, associados à técnica de manejo usada, foram apontados como prováveis factores etiológicos desta doença.

A produção comercial do linguado-branco envolve o uso de sistemas de recirculação da água que permitem um melhor controlo dos sistemas de produção, pelo que uma das prioridades da indústria é a melhoria do manejo desta espécie. Neste contexto, a problemática do desenvolvimento de bócio no linguado-branco é abordada numa perspectiva de optimização do manejo na sua produção em regime intensivo.

[Goiter in sole (*Solea senegalensis*, kaup): sole management importance in recirculation systems]

Thyroid tumors are rare in nature, their incidence being much higher in captive fish, particularly if maintained in an environment deficient in iodine.

Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) is an attractive species because of its high market value.

In three hundred and seventeen specimens of senegalese sole maintained in a closed circuit salt water system under natural conditions of photoperiod and temperature, hyperplasia of the thyroid has occurred.

Microscopy and ultra-structural studies of the affected thyroid indicated high activity although levels of T3 were very low. The condition was therefore classified as hyperplasia of the thyroid associated with hypothyroidism. The lesions found at the base of the branchial arches were classified as multinodular goiter.

Several factors may have contributed to the development of this disease i) dietary inadequacy, expressed by poor growth rates, may have aggravated the condition and ii) iodine deficiency of the water were identified as the probable causative factor.

With regard to future commercial developments, strong interest is expressed in the use of recirculation systems which allow better control of the environmental conditions and bio-security than open flow systems. In this context, greater importance will be given to specific requirements of the senegalese sole and hatchery operations that could represent a valuable method in prevention of goiter.

A maricultura na Madeira - o presente e o seu desenvolvimento

Cruz e Silva, M.P. e Nogueira, N.

Centro de Maricultura da Calheta, Direcção Regional de Pescas-Centro de Maricultura da Calheta

Actualmente a aquacultura desempenha um papel fundamental como fonte de alimento para consumo humano, sendo a Madeira uma região que reúne condições naturais ideais, para a maricultura em jaulas. Tendo em vista o desenvolvimento desta área, estão a decorrer no Centro de Maricultura da Calheta (CMC), desde 2006, dois projectos: + PEIXE e PARGOGEN. O projecto + PEIXE visa a produção em cativeiro dos estádios iniciais de vida de espécies de alto valor comercial, que permita maximizar a sua sobrevivência larvar e juvenil. O projecto PARGOGEN pretende desenvolver e aperfeiçoar as zootécnicas de produção do pargo (*Pagrus pagrus*).

Agradecimentos: Os projectos + PEIXE e PARGOGEN são co-financiados pelo FEDER - POPRAM III.

[The mariculture in Madeira - the present and the future]

Aquaculture is of growing importance as a supplier of healthy fish for human consumption. Due to its geographical situation and environmental conditions, Madeira has a great potencial to develop ocean farming activities. In order to contribute do the development of this economic activity in this region, the Centro de Maricultura da Calheta (CMC) has been running two projects since 2006, + PEIXE and PARGOGEN. + PEIXE intends to optimize the cultivation of early life stages of commercialy high valuable species, focusing goals such as minimizing mortality during the the larval and juvenile stages. PARGOGEN intends to develop and optimize the red porgy (*Pagrus pagrus*) production techinques.

Acknowledgments: + PEIXE e PARGOGEN are co-financed FEDER - POPRAM III.

Moluscicultura – uma produção animal sustentável

Ruano, Francisco

INRB, IP - L IPIMAR, Unidade de Investigação de Aquicultura. Av. de Brasília 1449-006 Lisboa

Os moluscos bivalves são, de entre os organismos aquáticos, os que melhor se adaptam aos mais adversos ecossistemas. A sua elevada capacidade para o aproveitamento de uma vasta gama dos recursos alimentares disponíveis, a sua fácil adaptação a situações extremas, sejam de grande carência alimentar ou de variações das condições físicas do meio, associadas à sua enorme capacidade gametogénica, tornaram estes macro invertebrados numa das espécies mais abundantes e mais antigas do nosso planeta.

Embora possuidores daquelas vantagens, os moluscos bivalves estão sujeitos a graves surtos de mortalidade massiva. Quando analisamos séries longas das abundâncias das suas populações naturais, é clássica a representação em curva sinusoidal, com flutuações dos «períodos» entre ciclos, por vezes de dezenas de anos. A explicação para estas grandes flutuações tem sido dada por diversos autores, atribuindo-as a causas diversas. O ciclo normal da espécie, adaptando-se às variações, por vezes longas e extremas das disponibilidades alimentares, é a explicação mais comum. Contudo o excessivo esforço de pesca, as patologias, as alterações do meio, os agentes poluidores, têm vindo ultimamente a engrossar o rol daquelas causas. É hoje consensual que as explicações para estas variações não residem tanto numa causa única para cada situação, mas antes na combinação de vários factores intercorrentes.

A gestão mais racional dos bancos naturais de bivalves em articulação com uma melhoria da qualidade do ambiente marinho, mercê de uma vigilância mais rigorosa, tem contribuído para a sustentabilidade daquelas populações enquanto recurso haliêutico.

O seu cultivo, recorrendo a métodos e técnicas cada vez mais eficientes, tem dado um contributo para aquela sustentabilidade, retirando pressão sobre as espécies mais exploradas e fornecendo ao mercado novas espécies, com garantias de um alimento de elevada qualidade e segurança.

[Molluscs aquaculture- a sustainable animal production]

The Molluscs bivalves are the organisms best adapted to the most sever aquatic ecosystems.

The high capacities to use a great variety of available food resources, their easy adaptation to extreme environmental conditions, in case of food shortage or drastic changes in their aquatic support, associated to a huge gametogenic capacity, make them one of the most ubiquitous and ancient macro invertebrates on earth.

Nevertheless those capacities, massive mortalities in bivalve populations are very common. Long series of the available data from natural populations, are frequently draw in a typical sinusoidal curve, with picks of abundance separated by periods of ten to twenty years. In between the long periods of abundance those populations almost reaches the disappearance.

The explanation for so long fluctuations has been related with several causes namely its adaptation to the natural rhythms of available food in nature. However the exaggerated rising of fishing efforts over the natural sea beds, diseases outbreaks, environmental changes in water column and sediments and pollution, has been reported as main causes for the decline of the specie. Nowadays is much more clear that there are no a single explanation for that, rather than a combination of several causes.

A rational management of natural sea beds and significant improvements of the quality of their environment, due to a most aggressive control, are a great contribution for the sustainability of this important marine resource.

Finally, by getting off the pressure over the natural sea beds, the modern mollusc aquaculture has been also an important factor for their protection as well as an important way to put in the market an excellent food with high patrons of quality and safety.

O desenvolvimento actual da aquacultura

Afonso, Fernando

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Actualmente, a aquacultura é o sector de produção de alimentos de maior crescimento em todo o mundo e existem condições e motivos para o seu futuro desenvolvimento, nomeadamente em Portugal. A utilização de todas as potencialidades de forma sustentável permite que o meio ambiente seja utilizado racionalmente e que a actividade possa ser praticada por muito tempo. A aquacultura contribui para preservar os ecossistemas de água doce e marinhos, diminuindo a pesca excessiva e mantendo as populações selvagens.

Alguns consumidores consideram que os produtos de aquacultura contêm antibióticos e outras substâncias químicas ou tóxicas. Na verdade, são raras as situações em que isto acontece e esta actividade apresenta vantagens relativamente à pesca tradicional de animais selvagens. Contudo, é necessário o estabelecimento e o cumprimento de regras que têm por fim a sustentabilidade social, ambiental e económica.

Pretende-se assim, analisar o estado actual da aquacultura e discutir as suas vantagens, a segurança alimentar dos produtos aquícolas, a sustentabilidade do sector e o bem-estar dos animais.

[The present development of aquaculture]

Nowadays, aquaculture became the world's fastest growing food production sector and there are conditions and motives for its future development in many countries, including Portugal. The environment can be then used rationally and the activity will be carried out for a long time if all of its potentialities are used in a sustainable way. Aquaculture contributes to preserve fresh water and marine ecosystems, decreasing overfishing and keeping wild populations.

Some consumers consider that aquaculture products contain antibiotics and other chemical and toxic substances. Facts show that these situations are rare and this activity has advantages when compared to traditional fisheries and catch of wild animals. However, it is necessary to establish and to accomplish rules to achieve social, environmental and economic sustainability.

The state of aquaculture will be analyzed and its advantages, food security of aquatic products, sector sustainability and animal welfare will be discussed.

Caracterização da variação da condição corporal de éguas puro-sangue lusitano em regimes extensivos

Fradinho, M.J.¹, Fernandes, R.², Mateus, L.¹, Correia, M.J.³, Vila-Viçosa, M.J.C.⁴, Ferreira-Dias, G.¹, Caldeira, R.M.¹

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Instituto Superior de Agronomia, TULisbon

3 Fundação Alter Real, Alter-do-Chão

4 Dep. Med. Veterinária, Universidade de Évora

A avaliação da condição corporal é um método prático e expedito que permite estimar as reservas corporais em diversas espécies pecuárias. A monitorização da variação destas reservas ao longo do ano faculta uma informação valiosa sobre a adequação dos regimes alimentares. A aplicação desta metodologia poderá ainda ser complementada através da apreciação das concentrações de alguns indicadores metabólicos em fluidos corporais, permitindo a detecção de desequilíbrios nutricionais. O presente estudo teve como principal objectivo avaliar a adequação das práticas alimentares de éguas Puro-Sangue Lusitano em regimes extensivos através da avaliação da variação da condição corporal e de alguns indicadores metabólicos. Mensalmente, a condição corporal foi avaliada em três grupos de éguas Lusitanas pertencentes a diferentes coudelarias, desde o nono mês de gestação até ao desmame. Nos mesmos dias procedeu-se à recolha de amostras de sangue para determinação das concentrações plasmáticas de ácidos gordos não esterificados (AGNE), glucose, ureia e albumina. Os alimentos distribuídos em complemento à pastagem foram igualmente sujeitos à recolha de amostras para análise nutricional. Os resultados foram estatisticamente submetidos a uma análise de variância univariada. A CC variou pouco entre o fim da gestação e o fim da lactação, entre ¼ e ½ ponto, e o seu valor foi influenciado pelo mês de parição. Nos três grupos de éguas foram observadas variações significativas nas concentrações de AGNE, de glucose, de ureia e de albumina ($P < 0,05$). Não se observaram contudo estados de sub-nutrição evidente. Pontualmente, foram detectados níveis elevados de proteína nas dietas. Este estudo contribuirá para identificar eventuais fases de carência ou excesso de alimentos face às necessidades nutricionais das éguas e permitir, assim, um melhor ajuste dos regimes e práticas alimentares.

[Characterization of body condition changes in lusitano broodmares under extensive systems]

Body Condition scoring is a useful and practical tool to access body reserves in livestock. Changes in body condition (BC) along the year could provide valuable information about the adequacy of feeding management. The assessment of some metabolites in body fluids could improve that information afforded by BC, allowing for the detection of nutritional unbalances. The main objective of this study was to evaluate the adequacy of feeding practices in Lusitano broodmares under extensive traditional management conditions using BC scoring and some metabolic blood indicators. Monthly, BC was assessed and blood samples were collected in three groups of mares from different stud farms, from the 9th month of gestation to weaning. Samples of supplementary feeds were also collected for nutritional assessment. Plasma concentrations of nonesterified fatty acids (NEFA), glucose, urea and albumin were determined. Data were statistically analysed by ANOVA. Changes on BC between the end of gestation and the end of lactation were small, between ¼ e ½ points, and were affected by the month of foaling. Differences on NEFA, glucose, urea and albumin concentrations were observed on the three stud farms ($P < 0,05$). However, under nutritional states were not observed. High levels of protein were occasionally detected in diets. This study would contribute to identify the periods when feeds quality and/or availability is excessive or insufficient to cope with nutritional requirements, allowing for a better application of feeding practices and management options.

Padrões de crescimento e desenvolvimento no poldro Puro-Sangue Lusitano

Fradinho, M.J.¹, Fernandes, R.², Gomes, T.¹, Correia, M.J.³, Vila-Viçosa, M.J.C.⁴, Silva, M.F.¹, Ferreira-Dias, G.¹, Caldeira, R.M.¹

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Instituto Superior de Agronomia, TULisbon

3 Fundação Alter Real, Alter-do-Chão

4 Dep. Med. Veterinária, Universidade de Évora

As características de temperamento e funcionalidade do cavalo Puro-Sangue Lusitano (PSL) permitem-lhe uma ampla utilização em diversas modalidades equestres. Por essa razão verifica-se, actualmente, um crescente interesse nesta raça ancestral, como cavalo de desporto. Para além das importantes relações já sugeridas entre a taxa de crescimento e o desenvolvimento ósseo, um melhor conhecimento dos padrões de crescimento poderá também contribuir para uma estimativa mais precisa das necessidades nutricionais dos poldros, durante esta fase. O presente estudo teve assim, como principal objectivo a caracterização do crescimento e do desenvolvimento de poldros PSL em sistemas extensivos, através da avaliação de alguns parâmetros biométricos. Para o efeito, foram mensalmente pesados e medidos (altura ao garrote – AG, perímetro torácico – PT e perímetro da canela - PC) trinta e cinco poldros nascidos em três coudelarias diferentes. A idade média ao desmame foi 7 meses de idade (209±5d). Antes do desmame, os animais permaneceram em regime de pastoreio e as éguas foram diariamente suplementadas com alimentos compostos e feno de gramíneas ou palhas de cereais, em quantidades que variaram de acordo com a disponibilidade de erva e as práticas de cada coudelaria. Na análise estatística dos dados foram testados modelos que incluíram o efeito do grupo e os efeitos quadráticos e lineares do tempo. O modelo que melhor se ajustou à descrição da variação do peso vivo (PV), da AG, do PT e do PC até aos 12 meses de idade foi o modelo quadrático, tendo o efeito do grupo sido significativo para o PV, o PT e o PC ($P < 0.0001$), o que poderá sugerir uma influência do tipo de manejo. O peso vivo estimado nos três grupos para os 7 e os 12 meses de idade, variou entre 211.1 - 253.8 kg e 276.1 - 327.7 kg, respectivamente, representando 42.2 a 50.8 % e 55.2 a 65.5 % do peso vivo adulto do PSL (500kg). O ganho médio diário até ao desmame variou entre 0.748-0.888 kg/d, diminuindo no período do pós-desmame para 0.353-0.493 kg/d. O ganho de peso entre o nascimento e o desmame representou entre 71.5 a 74.7 % do total dos ganhos de peso até aos 12 meses de idade. Os valores estimados para a AG, PT e PC aos 12 meses de idade variaram entre 135.4-140.9 cm, 145.4-157.5 cm e 16.7-19.0 cm, respectivamente. Estes resultados indicam padrões de crescimento semelhantes aos descritos para outras raças ligeiras de desporto, quando submetidos a níveis alimentares moderados, durante o primeiro ano de vida.

[Growth and conformation changes in the young Lusitano Horse]

The Lusitano horse is an ancient breed, with functional and behavioral characteristics that make possible its use in many different equestrian disciplines. For that reason, there is a rising interest in the Lusitano as a sport horse. Besides the suggested relationship between growth rate and skeletal development, a better understanding of growth patterns could contribute for an accurate estimation of the nutritional requirements in the growing horse. Therefore, the main objective of this study was to evaluate growth and development in Lusitano foals, under extensive management conditions in Portugal, by the assessment of some biometrical parameters. Thirty-five foals born and raised at three different stud farms were monthly weighed and withers height (WH), girth (G) and cannon circumference (CC) were also measured. Weaning average age was 7 mo (209±5d). Before weaning, all animals were kept on pasture and the mares were supplemented once a day with compound feeds and grass hay or cereals straw, according to pasture availability and farm practices. Statistical analysis was performed with a model including the effect of group and the linear and quadratic effects of time. Quadratic models were best fitted to describe the variation of body weight (BW), G, WH and CC until twelve months of age. The effect of group was significant for BW, G, and CC ($P < 0.0001$), suggesting a management influence. Estimated BW at 7 and 12 mo of age in the three groups, varied between 211.1-253.8 kg and 276.1-327.7 kg, respectively, representing 42.2-50.8 % and 55.2-65.5 % of Lusitano mature BW (500kg). Average daily gain until weaning varied between 0.748-0.888 kg/d, decreasing afterwards in the post-weaning period to 0.353-0.493 kg/d. Weight gain between birth and weaning represents 71.5-74.7 % of total weight gain until 12 mo of age. Estimated values for WH, G and CC at 12 mo of age varied between 135.4-140.9 cm, 145.4-157.5 cm and 16.7-19.0 cm, respectively. These results indicate a similar growth pattern to those described in other sport light breeds when submitted to moderate feeding levels, during the first year of life.

Parâmetros endócrinos de formação óssea e de puberdade em poldros de Raça Puro Sangue Lusitano

Fradinho, M.J.¹, Fernandes, R.^{1,2}, Correia, M.J.³, Mateus, L.¹, Robalo, J.¹, Caldeira, R.M.¹, Ferreira-Dias, G.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Instituto Superior de Agronomia, TULisbon

³ Fundação Alter Real, Alter-do-Chão

Vários marcadores bioquímicos, tais como a fosfatase alcalina óssea (BAP) e a osteocalcina (OC) têm sido usados para avaliar o metabolismo ósseo em poldros. Estudos realizados noutras espécies animais sugerem que a leptina desempenha um papel modulador no metabolismo ósseo e no momento do início da puberdade. A técnica de ultrasonografia quantitativa (QUS) é um método não invasivo já validado para cavalos para avaliar a qualidade do osso. Assim sendo, o principal objectivo deste estudo foi determinar (i) alguns parâmetros endócrinos de formação óssea (BAP e OC); (ii) características do tecido ósseo; e (iii) a relação entre a hormona leptina e o início da puberdade em poldros Puro-Sangue Lusitano (PSL; n=33). As poldras (n=14) e os poldros (n=19) foram mantidos em regime extensivo. O sangue foi recolhido por venopunção para a posterior realização de análises plasmáticas de BAP e OC por ELISA e de leptina, progesterona e testosterona por RIA. As características do tecido ósseo foram avaliadas no nível médio (lado lateral – L e dorsal-D) do terceiro metacarpo direito (MC III). Os dados foram analisados por ANOVA para medidas repetidas. Os valores obtidos no MCIII-L foram sempre superiores aos do MCIII-D ($p<0,05$). Com a idade dos animais verificou-se uma diminuição das concentrações plasmáticas de BAP e de OC ($p<0,05$). A concentração plasmática de leptina mostrou uma tendência para diminuir entre o período de pré-puberdade e de ciclicidade ovárica, decrescendo posteriormente no anestro ($p<0,01$). Nas poldras acíclicas a leptina apresentou valores semelhantes aos de anestro. Entre Abril e Junho, 57,1% das poldras mostraram actividade ovárica dos 12,7 aos 16,0 meses de idade ($13,6\pm 0,7$). Entre estas, 25% ovularam unicamente uma vez em Maio, enquanto que as restantes 75% ovularam duas vezes. Uma das poldras que ovulou duas vezes apresentou um corpo lúteo de duração prolongada antes de entrar em anestro. Somente um poldro (com início aos 12 meses de idade) teve concentrações de testosterona compatíveis com a puberdade ($\geq 0,5\text{ng/mL}$), entre Abril e Junho, embora a leptina plasmática tenha sido superior nos machos que nas fêmeas ($p<0,01$). O peso corporal das poldras aumentou desde o período pré-pubere até à ciclicidade ovárica ($p<0,05$) e anestro ($p<0,01$). Contudo, a condição corporal dos animais diminuiu durante o ensaio, o que pode explicar o decréscimo na leptina. Este estudo sugere que a leptina poderá ter que atingir uma determinada concentração plasmática para que as poldras iniciem a puberdade. Todos os indicadores sanguíneos avaliados nos poldros PSL mostraram um padrão semelhante ao de outras raças ligeiras de desporto.

[Endocrine Parameters of Bone Formation and Puberty in Lusitano Fillies and Colts]

Several biochemical markers such as bone alkaline phosphatase (BAP) and osteocalcin (OC) have been used to assess foals bone metabolism. Studies on some species also suggest a modulator role of leptin on bone metabolism and triggering the onset of puberty. The quantitative ultrasonography (QUS) is a non-invasive technique already validated for the horse to assess bone quality. Therefore, the main objective of this study was (i) to evaluate endocrine parameters of bone formation (BAP and OC); (ii) to assess bone tissue characteristics; and (iii) to determine the relationship between leptin and the onset of puberty in Lusitano foals (n=33). Fillies (n=14) and colts (n=19) were kept under extensive management. Blood was collected by venopuncture for further analysis of BAP and OC by ELISA and leptin, progesterone and testosterone by RIA. Bone properties were evaluated with a QUS device at the mid level (lateral – L and dorsal - D side) of right third metacarpal (MC III). Data were analyzed by use of ANOVA for repeated measures. Assessed values of MCIII-L were consistently higher than MCIII-D ($p<0.05$). BAP and OC decreased with age ($p<0.05$). Plasma leptin concentration tended to decrease between pre-puberty and cyclicity, and further decreased during anestrus ($p<0.01$). In non-cyclic fillies leptin was also decreased. Between April and June, 57.1% fillies, aged from 12.7 to 16.0 months (13.6 ± 0.7), displayed ovarian activity. Among these fillies, 25% ovulated only once in May, while the remaining 75% ovulated twice. One of the fillies that ovulated twice displayed a spontaneous prolonged corpus luteum before entering anestrus. Only one colt (starting at 12 months of age) had testosterone concentrations above the puberty threshold ($\geq 0.5\text{ng/mL}$), between April and June, even though plasma leptin was higher in males than in females ($p<0.01$). Fillies body weight increased from pre-puberal period to cyclicity ($p<0.05$) and to anestrus ($p<0.01$). However, their body condition decreased throughout the experiment, which might explain leptin fall. This study suggests that leptin might have to reach a threshold for fillies to enter puberty. The evaluated blood indicators in Lusitano foals showed a similar pattern to other sport light breeds.

Reprodução

Comunicação por convite

Diminuição da fertilidade das vacas leiteiras na região de Entre Douro e Minho: um problema incontornável?

Rocha, António e Carvalheira, Julio

Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

A rentabilidade da produção leiteira é em grande parte dependente da eficiência reprodutiva das manadas. No entanto, a fertilidade dos bovinos de leite tem vindo a decrescer de forma acentuada. Num estudo prévio (Rocha *et al.* 2001) abrangendo vacas nascidas entre 1980 e 1998 na região de Entre Douro e Minho, verificamos que a taxa de detecção de cios era muito reduzida (38%), resultando em intervalos parto-1ª IA (PIA) e parto-prenhez (PP) prolongados. No entanto, a taxa de concepção à 1ª IA era elevada, com uma percentagem de partos à 1ª IA de 51% e uma média de 1,4 IAs/prenhez. Para determinar a evolução da eficiência reprodutiva ao longo dos anos, analisamos os índices reprodutivos referentes ao período de 1992 a 2002, para os efectivos de vacas da mesma região. Utilizaram-se modelos estatísticos lineares para a análise dos dados e, dependendo do parâmetro e sempre que apropriado tomaram-se em consideração os efeitos de manada/ano/mês ou estação do ano. O número de registos avaliados por índice variou de 12.130 a 57.589. A idade ao primeiro parto foi de $28,9 \pm 0,14$ meses, não tendo sofrido variações significativas ($p > 0,05$). No entanto, verificou-se uma deterioração lenta mas significativa ($p < 0,05$) de todos os outros índices, para o período de estudo. Assim, a taxa de não retorno aos 90 dias e a percentagem de partos à 1ª IA decresceu 0,3% por trimestre, com um conseqüente aumento de 0,04 IA/parto. A taxa de detecção de cios diminuiu 0,13% ao ano, e os intervalos parto-1ªIA e parto-prenhez aumentaram 0,17 e 0,07 dias/ano, enquanto que o aumento anual do intervalo entre partos foi de 1,7 dias. De 12.130 vacas que tiveram o primeiro parto, apenas 1.816 chegaram à 4ª lactação (85% de taxa de refugo). O estudo não foi desenhado para identificar as causas das variações temporais de fertilidade. No entanto, o aumento da produção de leite (305 dias) de 6.537 kg em 1996 para 7.727 kg em 2002 deverá ter influenciado estes resultados. Opina-se que se devem implementar medidas específicas para inverter ou diminuir a tendência verificada de diminuição progressiva da fertilidade, e discutem-se as alternativas existentes.

[Decreasing fertility of dairy cows in the Entre Douro e Minho region of northern Portugal: an irreversible problem?]

The economics of dairy production are in great part dictated by the reproductive efficiency of the herds. However, a widespread decrease in fertility of dairy cows has been noted. In a previous study (Rocha *et al.* 2001) based on cows born from 1980 and 1998 in the Entre Douro e Minho region, we found a very poor oestrus detection rate (38%), and consequently a delayed calving to 1st AI and calving to conception intervals. However, a good conception rate at 1st AI was noted (51%) resulting in a low number of inseminations per pregnancy (1.4). A subsequent study was carried out in the same region, for cows born from 1992 to 2002, to assess fertility time trends. Statistical linear models were used to analyse the data. Estimate linear contrast of least square means were computed from each model. The number of observations per studied index varied ranged 12,130 (culling rate) to 57,589 (non-return rate). Mean age at first calving was 28.9 ± 0.14 months, without ($P > 0.05$) variation over time. There was a small, but significant ($P < 0.05$) deterioration of all other parameters. Non-return rates at 90 days and calving rate at 1st AI decreased 0.3% per trimester with a consequent increase of 0.04 IA/parturition. Oestrus detection rate decreased 0.13% per year, and calving-1st AI and calving-conception intervals increased 0.17 and 0.07 days/year respectively, while intercalving interval increased 1.7 days per year. From 12,130 cows calving, only 1,816 had a 4th lactation (85% culling/losses). The data did not allow drawing conclusions on the causes for the decreased fertility over time, but an increase of milk production from 6,537 kg to 7,727 kg (305 days) from 1996 to 2002 is probably one factor to take into consideration. Specific measures to revert or slow down this trend of decreasing fertility are warranted. Available strategies are discussed.

Avaliação preliminar por citometria de fluxo das alterações sazonais na qualidade do sémen após criopreservação no garanhão Lusitano

Agrícola, R.^{1,3}, Chaveiro, A.¹, Robalo Silva, J.², Lopes da Costa, L.F.², Horta, A.E.M.³, Moreira da Silva, F.¹

¹ Departamento de Ciências Agrárias – Reprodução Animal, Universidade dos Açores, 9700 Angra do Heroísmo

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

³ INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

No presente trabalho estudámos as variações sazonais do sémen nos garanhões Lusitanos com objectivo de estabelecer o melhor período para a criopreservação do sémen. Tendo conhecimento das variações sazonais existentes nas éguas (Ferreira-Dias *et al*, 2005) e no sémen fresco de garanhões (Robalo Silva *et al*, 2007), avaliamos, por citometria de fluxo, as variações sazonais das características seminais após criopreservação do sémen.

Utilizámos cinco garanhões Puro Sangue Lusitano propriedade da Coudelaria Nacional. Os ejaculados foram recolhidos e avaliados em quatro períodos definidos como Primavera (Março/Abril), Verão (Junho/Julho), Outono (Setembro/Outubro) e Inverno (Dezembro/Fevereiro). As colheitas foram feitas uma vez por semana durante 4 semanas e a criopreservação do sémen em palhinhas de 0,5 ml. Avaliaram-se parâmetros qualitativos do sémen descongelado (viabilidade, motilidade e HOST) por microscopia óptica. A viabilidade espermática e integridade acromossómica foram avaliadas por citometria de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). Foram utilizadas as combinações das sondas fluorescentes de iodeto de propidium (PI) e SYBR-14 (LIVE/DEAD Sperm viability Kit (L-7011) da Molecular Probes) para a viabilidade espermática. Em conjunto, integridade do acrossoma foi avaliada pelos fluorocromos FITC-PNA (Sigma Chemical, St. Louis, MO) e iodeto de propidium (PI). Os resultados foram analisados pelo programa Cell-Quest (Becton Dickinson, San Jose, California, USA) e diferenças estatísticas por “one-way ANOVA”, seguidos de teste de comparação.

Os resultados sobre a viabilidade do sémen descongelado avaliada por citometria de fluxo, relativa aos ejaculados recolhidos durante o Outono (37,73±2,20 %) e Verão (40,99±4,08%) diferem significativamente das outras estações, Inverno (54,26±2,10 %) e Primavera (46,71±2,32%) (P<0,05). A viabilidade foi igualmente significativamente diferente entre cavalos (P<0,0001). O elevado número de espermatozóides mortos após o processo de descongelamento das colheitas efectuadas durante o Outono/Verão indicam que as variações sazonais relativas aos compostos do plasma seminal poderão influenciar a preservação do sémen. Contudo, não se observaram diferenças significativas relativas à integridade do acrossoma entre épocas mas entre cavalos houve diferença significativa (P<0,0001). Observou-se uma elevada correlação entre a viabilidade e integridade do acrossoma (r=0,91, P<0,03). A viabilidade, a percentagem de móveis e o teste HOS, avaliados por microscopia, só apresentaram diferenças significativas entre cavalos (P<0,0001).

Os resultados do presente estudo demonstram que, nas nossas condições clima/latitude, as diferenças sazonais influenciam a qualidade do sémen após criopreservação, apontando o Inverno/Primavera como as melhores épocas.

[Preliminary evaluation of seasonal semen freezability from Lusitano stallions using flow-cytometry]

In the present study, seasonal changes in Lusitano stallion's semen quality were evaluated to establish the best time for semen cryopreservation. In other studies, on testicular size, seminal characteristics and ovary development, seasonal changes were observed (Ferreira-Dias *et al*, 2005; Robalo Silva *et al*, 2007). In this work we evaluated the seasonal semen freezability by flow cytometry.

For such purpose five Lusitano stallions belonging to “Coudelaria Nacional” were used, in four periods of semen collection defined as spring (March/April), summer (June/July), autumn (September/October) and winter (December/February). Ejaculates were collected once a week for 4 weeks, and cryopreserved in 0.5 ml plastic straws. Before and after each period of semen collection, testicular measurements were taken from all stallions. Viability, motility and HOST were also evaluated by microscopy. A flow cytometer (Becton Dickinson, USA) was used to evaluate sperm viability and acrosomal by using the combination of fluorescent probes propidium iodide (PI) and SYBR-14 (LIVE/DEAD Sperm viability Kit (L-7011) from Molecular Probes, Eugene, Oregon) for sperm viability. In addition, acrosome integrity was evaluated using FITC-PNA (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and propidium iodide (PI) probe. Results were evaluated by the Cell-Quest software (Becton Dickinson, USA) and statistical differences by a one-way ANOVA, followed by post-hoc comparison tests.

Results from viability evaluated by flux-cytometry, in frozen-thawed semen from ejaculates collected in autumn (37.73±2.20%) and summer (40.99±4.08%) differ significantly from winter (54.26±2.10%) and spring (46.71±2.32%) (P<0.05). This viability was also significantly different among stallions (P<0.0001) The high number of dead spermatozoa after the freezing-thawing process in autumn/summer most likely indicates that seasonally related changes in seminal plasma compounds may affect semen preservation. Nevertheless, no significant differences were observed for acrosome integrity among seasons, but it was significantly different among stallions (P<0.0001). A high significant correlation was observed between viability and acrosome integrity (r=0.91, P<0.03). Viability, motility and HOST evaluated by microscopy were different among horses (P<0.0001) but not among seasons.

The results of the present study clearly demonstrated that, in our climatic/latitude conditions, seasonal differences occur on stallion's semen quality after cryopreservation, being preferable to freeze in winter/spring period, instead of other seasons.

Maneio reprodutivo para inseminação artificial (IA) com sémen congelado: perspectivas de desenvolvimento

Guimarães, T., Atayde, L., Rocha, A.

Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

Introdução: O interesse pela IA de equinos com sémen congelado tem vindo a aumentar no país, apresentando esta técnica uma problemática diferente da encontrada com IA com sémen fresco/refrigerado. Descreve-se o maneio seguido no centro de reprodução de equinos do ICBAS e os principais problemas encontrados.

Maneio: Não se aceitam animais em regime ambulatorio, mas presta-se serviço externo para verificar da ciclicidade dos animais e confirmar gestações. À entrada as éguas são sujeitas a exame clínico genital, decidindo-se da necessidade de tratamentos ou exames complementares. Faz-se citologia uterina e microbiologia uterina/clitóris, incluindo despiste para *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e biopsia uterina quando necessário. As éguas ficam em box individual ou em paddocks de 5 animais. Osaios são detectados às segundas, quarta e sextas. Uma vez em estro, iniciam-se ecografias diárias. Após detecção de foliculo ovarico com diâmetro >35 mm administra-se 1500UI de hCG e passadas 24 horas executam-se ecografias em intervalos de 6 horas até confirmação da ovulação. Logo que esta é detectada, o sémen é descongelado e a dose inseminante é aspirada para pipeta estéril, procedendo-se à IA convencional ou profunda, dependendo da qualidade do sémen e características uterinas. Cerca de 200 µl de sémen são separados e utilizados para avaliação morfológica e determinação da concentração (hemocítometro). Considera-se obrigatório a presença de 2 operadores. Executa-se o diagnóstico de gestação aos 12 d, repetindo-se exame aos 16-18 dias (duplas ovulações aos 14 dias). Confirma-se gestação aos 60 dias.

Principais limitantes: Os principais problemas encontrados referem-se à menor taxa de fertilidade obtida com sémen congelado e à existência de expectativas irrealistas (por ex. esperar 70% de gestações com 1 dose inseminante) e ao desconhecimento das características da época de transição. Têm sido apresentadas éguas para IA com comportamento de cio mas anovulatórias (transição) e algumas doses de sémen são sub-ótimas (< 300 x 10⁶ com motilidade progressiva). Várias éguas estão em final de carreira desportiva (>18 anos) sendo subférteis, e há incompreensão sobre a necessidade de incorrer em gastos extra para despiste de enfermidades venéreas. Por último, nota-se exaustão dos veterinários devido à frequência dos exames ecográficos.

Perspectivas: O esclarecimento aos proprietários sobre as características da fase de transição e sobre necessidade de despiste de doenças venéreas tem tido boa aceitação, e o contacto com os fornecedores de sémen tem permitido resolver problemas de dose/qualidade de sémen, resultando num incremento do interesse pela técnica. Sugere-se a implementação de um esquema reduzido de ecografias, sempre que seja viável a utilização de 2 doses de sémen/ovulação.

[Artificial insemination (AI) with frozen semen: basic management and perspectives of development]

Introduction: The use AI with frozen semen has great potential to the horse industry. However, its use presents specific problems. Here we describe the basic management used in the Institute's Equine Reproduction Centre, point out the main shortcomings found, and discuss perspectives of development.

Management: No ambulatory services are provided, except for confirming maintenance of pregnancies or determining reproductive cyclicity. Mares are boarded in individual boxes or in paddocks for 5 animals. All mares are subjected to a gynecological examination at admission, when need for further exams and/or treatments are established. Uterine and clitoral swabs are obtained for cytological and microbiological exams, including for *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Uterine biopsies are done when deemed necessary. Routine estrus detection is performed Mondays, Wednesdays and Fridays. Ultrasound examination is done every 24 hrs in all oestral mares. Upon detection of a follicle >35mm in diameter hCG is administered followed 24 hrs later by ultrasound scanning of the genitalia, every 6 hrs. Once ovulation is detected, frozen semen is thawed, aspirated into a pipette and conventional or deep AI performed, depending on semen quality and/or uterine characteristics. Approximately 200 µl of semen is kept for morphological and concentration assessment. Presence of two operators is mandatory. Ultrasonographic pregnancy check is performed 12 days after AI and repeated 16 to 18 days post AI (14 days for double ovulators). Sixty days post AI a final pregnancy confirmation is done.

Shortcomings: A lower pregnancy rate is obtained with frozen semen when compared with chilled/fresh semen. Often, owners have an unrealistic understanding of expectable results (for example, hoping for 70% pregnancy with one AI). Poor understanding of vernal transition, leads to the insistence to AI anovulatory mares in behavioral estrus. Occasionally, number of sperm cells for an AI is below optimal standard (<300x10⁶ motile cells). Additional costs for the diagnosis of venereally-transmitted diseases are questioned. Old (>18 yrs), subfertile retired sports mares, make a considerably proportion of animals presented for AI. At peak breeding season exhaustion of veterinarians is noticeably due to high frequency of ultrasound scannings.

Perspectives: Successful communication with owners in relation to reasonable goals to expect, characteristics of the vernal transition, risks of venereally-transmitted diseases, as well as a positive resolution of problems related to substandard semen doses, has resulted in a better acceptance of the technique. When possible, utilization of protocols with two AI/ovulation is suggested to decrease the intensity of veterinary intervention.

Características comportamentais, dinâmica ovárica e características uterinas durante a época de transição da primavera

Atayde, L., Rocha, A.

Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

Introdução: O conhecimento das características de comportamento, da dinâmica folicular ovárica e das características ecográficas do útero são de importância primordial para se poder antecipar a data do início da gestação. Com este trabalho pretendeu-se verificar quais as características que melhor podem prever a data da primeira ovulação do ano em éguas em transição.

Material e Métodos: Utilizaram-se 9 éguas (4-18 anos), iniciando-se a detecção deaios a 5 de Janeiro. Após sinal de cio as éguas eram ecografadas em dias alternados, passando as ecografias a diárias, quando se detectava um foliculo com diâmetro >30mm. O aparecimento, pela primeira vez, das seguintes características ecográficas, foi registado: edema do útero, invaginação da parede do foliculo dominante, aumento da ecogenicidade intra-folicular, contorno duplo da parede folicular, espessamento da granulosa, hiperecogenicidade da parede do foliculo, aparecimento de formato piriforme do foliculo. Registaram-se ainda diâmetros foliculares e número de foliculos/ovário.

Resultados: Setenta por cento das éguas apresentaramaios anovulatórios ($2,4 \pm 2,27$ aios/égua) com uma duração de $4,63 \pm 3,62$ dias, e um intervalo inter-estrua de $12,50 \pm 12,23$ dias. O edema do útero ocorreu em 77 % das éguas, em média $32,43 \pm 25,61$ dias antes da ovulação. Verificou-se invaginação da parede do foliculo em 44,44% das éguas, ocorrendo esta característica $24,50 \pm 18,36$ dias antes da ovulação. Todas as éguas apresentaram aumento da ecogenicidade do fluido intra-folicular, e 77% das éguas tiveram foliculo com contorno duplo, 1 a 72 dias antes da ovulação. O espessamento da granulosa foi visto em 66 % dos animais, 1 a 19 dias antes da ovulação. Tanto o formato piriforme como hiperecogenicidade da parede do foliculo apareceram 3 ou menos dias antes da ovulação, respectivamente em 44,44% e 55,50% das éguas. Verificou-se um aumento acentuado do n.º de foliculos no início da época de transição, decaindo o número médio de foliculos >15mm de 4 para menos de 2,5, pelo menos nos 16 dias anteriores à ovulação.

Conclusão: Considerando apenas comportamento de cio e tamanho folicular, poder-se-ia ser induzido a executar erroneamente inseminações em mais de 4aios anovulatórios. Nenhuma característica individual permite prever com aproximação o dia da 1ª ovulação. O espessamento da granulosa que apareceu 1 a 19 dias antes da ovulação (66% das éguas), o formato piriforme e a hiperecogenicidade da parede folicular (3 ou menos dias antes da ovulação; 44% a 51% da éguas), a redução do número de foliculos no ovário (16 ou menos dias antes da 1ª ovulação) parecem oferecer o conjunto de sinais mais úteis para prever a proximidade da 1ª ovulação em éguas em transição.

[Behavioural characteristics, follicular dynamics and uterine characteristics during vernal transition in mares]

Introduction: A clear understanding of the oestral behavioural, follicular dynamics and uterine characteristics of the mare during vernal transition, is essential to obtain pregnancies early in the season. The objective of this study was to identify ovarian and uterine characteristics that could be used as indicators of an impending first ovulation.

Material and Methods: Starting January 5, nine mares aged between 4 and 18 years old were teased with a stallion for estrus detection and subjected to ultrasonographic examination every second day once positive signs of estrus were seen. When a follicle >30mm in diameter was detected, daily ultrasound scanning was performed. The first day of the appearance of the following ecographic characteristics was registered: uterus edema, follicular wall invagination, increased intra-follicular echogenicity, double contour of the follicle, granulosa thickness increase, follicular wall hyperechogenicity, pear shaped follicles. Follicular diameters and number of follicles/ovary were also recorded.

Results: Seventy percent of the mares had anovulatory estrus (2.4 ± 2.27 estrus/mare), with average length of 4.63 ± 3.62 days and an inter-estrua interval of 12.50 ± 12.23 days. Uterus edema occurred in 77% of mares, in average 32.43 ± 25.61 days before ovulation. Invagination of the follicular wall appeared on 44.44% of the animals, in average 24.50 ± 18.36 days before ovulation. In all mares there was an intra-follicular echogenicity increase and in 77% animals a double contour of the follicle, both characteristics being present between 1 to 72 days before ovulation. Granulosa thickness increase occurred on 66% of mares 1 to 19 days before ovulation. Both pear shaped follicles and follicular wall hyperechogenicity were detected by the first time 3 or less days before the first ovulation, on 44.44% and 55.50% of mares, respectively. There was a high increase of the number of follicles in the beginning of vernal transition, with the mean number of follicles >15 mm decreasing to less than an average of 2.5, at least sixteen days before ovulation.

Conclusions: If breeding based only on estrus behavior and follicular size, as many as 4 inseminations can be done in anovulatory estrus. No single studied characteristic is a reliable indicator of impending ovulation. However, taken together, the granulosa thickness increase that appeared 1 to 19 days before ovulation (66% of the mares), the pear shaped follicle and the follicular wall hyperechogenicity (3 or less days before ovulation in 44% and 51% of the mares, respectively) as well as the reduction of the number of follicles (16 days before ovulation), are useful indicators of approaching ovulation in transitional mares.

Eficiência reprodutiva em bovinos de carne: I – Análise de parâmetros e perspectivas de selecção; II – Factores ambientais e manejo reprodutivo

Bettencourt, C.¹, Carolino, N.²

¹ Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo, Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Serpa
² INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

I - Análise de parâmetros e perspectivas de selecção. O número de vitelos produzidos por vaca e por ano é um dos factores com maior impacto na eficiência biológica e económica na produção de bovinos de carne. Esta característica torna-se ainda mais importante para as raças exploradas como linha materna, em regime extensivo, como é caso da maioria das raças bovinas autóctones.

Através da análise dos registos produtivos disponíveis em diversas Associações de Criadores de Bovinos, verifica-se que as performances reprodutivas da maioria de parte dos efectivos estão aquém do que se poderia *à priori* considerar com o ideal. Por este motivo, a melhoria das características reprodutivas, maternas e de “rusticidade” (adaptabilidade) são frequentemente realçadas como prioridades para as raças bovinas.

Nos últimos anos, as características reprodutivas e de longevidade têm merecido especial atenção no âmbito dos programas de selecção de bovinos de carne em todo o mundo, devido essencialmente à sua importância económica para os respectivos sistemas de produção. Contudo, a possibilidade de selecção para estes caracteres continua a ser questionada, uma vez que as estimativas da heritabilidade (h^2) e repetibilidade (re) obtidas por vários autores são geralmente baixas (<0.10). Como a resposta anual à selecção (ΔG_{ano}) não depende exclusivamente da heritabilidade, mas sim de um conjunto de parâmetros, tais como a intensidade de selecção (i), a precisão da avaliação dos candidatos à selecção (r_{AP}), desvio padrão genético (σ_A) e o intervalo de gerações (L), a combinação destes parâmetros deverá ser otimizada por forma a que a resposta esperada seja aceitável.

II - Factores ambientais e manejo reprodutivo. O conceito de eficiência reprodutiva em bovinos explorados para a produção de carne engloba a definição da “melhor” vaca: “*Aquela que durante a sua vida produz melhor e maior número/peso de vitelos*”. Para além de uma forte componente genética, são vários os factores ambientais e de manejo que poderão afectar o grau de eficiência reprodutiva de um efectivo bovino. Como técnicos ou criadores podemos e devemos questionar-nos em como otimizar estes índices de produtividade. Como podemos aumentar a sua “vida” reprodutiva? Antecipando a idade ao 1º parto e/ou refugando a uma idade mais avançada. Como reduzir o intervalo entre partos? Melhorando a taxa de fertilidade e encurtando o período de anestro pós-parto. São inúmeros os factores de natureza ambiental que podemos manipular para que no final obtenhamos um aumento do nº de kg de vitelo desmamado por vaca reprodutora. Torna-se indispensável proceder a uma recolha e análise de dados de forma a poder definir estratégias. Interpretados os factores que poderão condicionar os índices de produtividade do efectivo definimos áreas de intervenção. Incide-se no manejo nutricional, manejo do efectivo reprodutor jovem, prevenção de distócias, fertilidade do touro e controlo sanitário da exploração. A implementação de um programa alimentar para que a fêmea atinja um peso mínimo á cobrição e esteja em boa condição corporal ao parto, a utilização de touros sem registo de dificuldades ao parto, o diagnóstico de gestação programado, o recurso a tratamentos hormonais, a realização de exames andrológicos aos touros e o rastreio de doenças infecciosas, são algumas das medidas a que podemos recorrer de forma a otimizar os índices de produtividade de um efectivo bovino explorado para a produção de carne.

[Reproductive efficiency in beef cattle: I – Analysis of parameters and perspectives of selection. II – Environmental factors and reproductive management]

I - Analysis of parameters and perspectives of selection. The calf output produced annually in a beef cow herd is the major parameter in measuring productive and economic efficiency. This measurement becomes more important for those breeds, such as most of the Portuguese autochthones breeds of cattle, exploited in dam’s line and extensive range conditions. The analysis of productive data bases, provided by distinct Portuguese cattle breeders associations, suggest that the reproductive performance of most herds is far away from being satisfactory. For this reason, the need to improve maternal reproductive characteristics and rusticity (adaptability) are considered major priorities for beef cattle breeds. Over the past years, special attention has been given all over the world to programs of genetic selection for beef cattle concerning reproductive characteristics and longevity. The possibility of selection for these parameters remains questionable as values predicted of heritability (h^2) and repeatability (re), obtained by different authors, are generally low (<0.10). As annual response to selection ($\Delta G/year$) does not depend exclusively on heritability, but also upon other parameters such as intensity of selection (i), precision on the process of evaluating candidates to selection (r_{AP}), genetic standard error (σ_A) and interval between generations (L), the combination of these parameters must be optimized in order to assure that the response expected be acceptable.

II - Environmental factors and reproductive management. The concept of reproductive efficiency in beef cattle includes the definition of the “best cow”: “*The one that during her lifetime produces better and greater number/weight of calves*”. Despite a strong genetic component, there are several environmental and management factors that affect the level of reproductive efficiency in a beef herd. As a producer or as an expert we must ask ourselves on how to maximize reproductive efficiency. How can we extend the reproductive lifetime of a cow? Anticipating age at first calving and/ or extending culling age. How to reduce calving intervals? Improving fertility and reducing the length of the postpartum anestrus. There are distinct environmental factors which we can manipulate in order to achieve the goal of increasing the weight of calve weaned per cow mated. First, we must record, analyze and interpreter reproductive data from the herd in order to define a strategy. We may than focus on aspects such as nutritional management of cows, general management of heifers, prevention of dystocias, bull fertility and sanitary control of the herd. Management procedures adopted in order to assure that heifers achieve a target weight at mating, the use of bulls with no records of dystocia, programmed gestation diagnosis of cows, reproductive hormonal treatments, regular breeding soundness examination of bulls, and screening of infectious diseases, are only some of the tools we have available in order to maximize reproductive efficiency in beef cattle.

Efeito do ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 (*t10,c12CLA*) no perfil em ácidos gordos dos oócitos bovinos durante a maturação

Lapa, M., Marques, C.C., Alves, S.P.², Vasques, M.I., Baptista, M.C., Carvalhais, I.², Horta, A.E.M., Bessa, R.J.B.¹, Pereira, R.M.

Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal, INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

1 Unidade de Produção Animal, INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

2 Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, 9700 Angra do Heroísmo, Açores

Os lípidos apresentam um importante papel no armazenamento energético, na estrutura celular, assim como nas propriedades físicas e funções metabólicas das membranas biológicas. Embora nos oócitos e embriões esta composição e função sejam ainda pouco conhecidas, já está amplamente identificada a acumulação excessiva de lípidos nos embriões produzidos *in vitro* (IVP). Resultados prévios demonstraram que o *t10,c12CLA* diminui a deposição de gotículas lipídicas no citoplasma dos embriões durante a cultura, aumentando significativamente a resistência destes à criopreservação. Contudo, esta suplementação nunca foi efectuada durante a maturação dos oócitos.

Pretendeu-se testar o efeito da suplementação de meios de cultura com soro e *t10,c12CLA* na maturação oocitária, no perfil lipídico e subsequente sobrevivência dos oócitos vitrificados. Oócitos bovinos recolhidos em matadouro foram maturados em TCM199+10% soro+10 µg mL⁻¹ FSH + 100 µM GSH suplementado ou não com 100 µM *t10,c12CLA*, durante 22-24h a 39 °C numa atmosfera húmida com 5% CO₂. Oócitos maturados (OOMAT) foram vitrificados em palhinhas SOPS (superfine open pulled straws; OOMAT n=313, OOMAT*t10,c12CLA* n=321, 7 sessões). Oócitos desnudados foram utilizados para análise dos ácidos gordos (imaturados-OOIMAT n=343, OOMAT n=348, OOMAT*t10,c12CLA* n=341) ou avaliação da taxa de maturação (coloração nuclear com aceto-lacmóide; OOMAT n=116, OOMT*t10,c12CLA* n=116). O perfil de ácidos gordos foi analisado (4 amostras cada) nos OOIMAT, OOMAT, nas células do cumulus e meios de cultura (CM) suplementados ou não com 100 µM *t10,c12CLA*. As amostras foram homogeneizadas com clorofórmio:metanol (2:1, v:v) em fresco. Determinou-se a composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa. Os resultados foram analisados por ANOVA/LSD.

A suplementação com *t10,c12CLA* não interferiu na taxa de maturação ou de sobrevivência dos oócitos descongelados. O total em ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) foi superior (P<0,0001) nos CM do que nos oócitos e células do cumulus, independentemente do estadio de maturação ou da presença de *t10,c12CLA*. Foram detectadas diferenças entre grupos nos PUFA, C18:2n-6 (P=0,0001), C18:3n-3 (P=0,002), C20:3n-6 (P=0,0002) e C20:5n-3 (P=0,004). O teor em ácidos gordos totais (AGT, µg/oócito) dos OOIMAT e OOMAT foi superior (P<0,04) ao dos OOMAT*t10,c12CLA*, contudo não houve alteração no perfil em ácidos gordos.

Em conclusão, estes resultados sugerem que a presença do *t10,c12CLA* não se reflectiu na maturação ou sobrevivência após congelação dos oócitos interferindo, no entanto, no seu metabolismo lipídico. Esta acção reduziu significativamente os AGT durante a maturação dos oócitos sem alterar o perfil em ácidos gordos, independente, da composição do CM. A possível repercussão destes resultados no desenvolvimento embrionário deverá ser investigada.

[Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (*t10,c12 CLA*) on bovine oocyte fatty acid profile during maturation]

Lipids play a significant role in energy storage, cell structure and in modifying the physical properties and metabolic function of biological membranes. Although their composition and function in oocytes and embryos are not fully understood, the excessive lipid content of *in vitro* produced embryos (IVP) has been extensively identified. Previous results showed that *t10,c12CLA* decreases embryo cytoplasmic lipid deposition during *in vitro* culture and significantly improves resistance of IVP embryos to cryopreservation. However, this supplementation has never been attempted during oocyte maturation.

Our objective was to examine the effects of supplementing serum-containing culture media with *t10,c12CLA* on oocyte maturation, lipid profile and its subsequent cryosurvival. Abattoir-derived oocytes were matured in TCM199+10% serum+10 µg mL⁻¹ FSH + 100 µM GSH supplemented or not with 100 µM *t10,c12CLA* during 22-24 h at 39 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Matured oocytes (OOMAT) were vitrified in superfine open pulled straws (control n=313, *t10,c12CLA* n=321, 7 sessions). Denuded oocytes were used either for fatty acid analysis (immature-OOIMAT n=343, OOMAT n=348, OOMAT*t10,c12CLA* n=341) or maturation rate evaluation (aceto-lacmoid nuclear staining, OOMAT n=116, OOMT*t10,c12CLA* n=116). Fatty acid profiles in immature and mature oocytes, cumulus cells (CC) and culture media (CM) supplemented or not with 100 µM *t10,c12CLA* (4 samples each) were analysed. Fresh samples were homogenized in chloroform:methanol (2:1, v:v). Fatty acid composition of total extracted lipids was determined by gas chromatography. Data were analyzed using ANOVA and LSD.

t10,c12CLA supplementation did not interfere either on oocyte maturation or survival after warming. Total polyunsaturated fatty acids (PUFA) were superior (P<0.0001) in CM than in oocytes or cumulus cells independently of *t10,c12CLA* supplementation or oocyte maturation status. Differences on PUFA, C18:2n-6 (P=0.0001), C18:3n-3 (P=0.002), C20:3n-6 (P=0.0002) e C20:5n-3 (P=0.004) were identified among groups. Total fatty acids (TFA, µg/oocyte) of OOIMAT and OOMAT were higher (P<0.04) than in OOMAT*t10,c12CLA* although fatty acid profile was not changed.

In conclusion, these preliminar results suggest that *t10,c12CLA* did not influence oocyte maturation or cryosurvival. However, this isomer interfered on lipid metabolism, reducing oocyte TFA during maturation although maintaining its fatty acid profile, independently of culture media composition. Further studies are needed to confirm the repercussion of these results on embryo development.

A utilização de sêmen fresco na fertilização *in vitro* de embriões ovinos melhora a qualidade dos blastocistos na raça portuguesa Merino

Romão, R.¹, Marques, C.C.², Baptista, M.C.², Vasques, M.I.², Barbas, J.P.², Horta, A.E.M.², Bettencourt, E.¹, Pereira, R.M.²

¹ Universidade de Évora, Polo da Mitra, Valverde, Évora

² Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal, INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

A produção de embriões em ovinos é uma tarefa difícil, exigindo experiência e condições onerosas, principalmente na produção de embriões *in vivo*. A recolha sistemática de oócitos em animais de matadouro ou em animais vivos por ovum *pick-up*, permite a produção *in vitro* de embriões (IVP), em larga escala e menos dispendiosa, nos pequenos ruminantes. Esta possibilidade é importante não só como fonte de embriões mas também de oócitos e zigotos para fins comerciais ou de investigação, facilitando a sua disponibilidade em tecnologias emergentes tais como a clonagem ou a transgénese. Para IVP foram desenvolvidos vários protocolos de maturação, utilizando fertilização *in vitro* (IVF) com sêmen fresco ou congelado. Em Portugal, a produção de embriões *in vitro* foi somente realizada com sêmen congelado dada a sua disponibilidade em condições de rotina. Contudo, o sêmen fresco poderá melhorar a produção de embriões frescos ou criopreservados.

Este trabalho teve como objectivo comparar a eficiência da IVP em ovinos usando diferentes protocolos de maturação de oócitos e IVF com sêmen fresco ou congelado. Oócitos (n=1768) recolhidos em matadouro foram maturados em meio TCM199 com 100 µM cisteamine, 10 ng mL⁻¹ EGF, 10 µg mL⁻¹ E2 e gentamicina (mat A, n=692) ou suplementada com 10 µg mL⁻¹ FSH e 0,3 mM piruvato de sódio (mat B, n=707) a 39 °C e 5% CO₂ durante 22h. O sêmen fresco (FS) e congelado/descongelado (TS) de carneiros de raça Merino Branco (n=3) foi lavado ou submetido a swim-up, respectivamente. Após a fertilização (18h p.i.), os presumíveis zigotos foram cultivados em meio de fluido sintético do oviducto (SOF) enriquecido com aminoácidos e BSA a 38,5 °C, em atmosfera humidificada com 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ até ao estadio de 2-4-8 células. Após clivagem, o desenvolvimento embrionário prosseguiu até ao estadio de blastocisto em meio SOF, BSA e 10% FCS. A qualidade foi avaliada no dia 6-7, classificando-se como bons, médios e maus, baseado nos parâmetros IETS. Os dados das taxas de produção embrionária foram analisados utilizando ANOVA. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney U para avaliação da qualidade dos embriões.

Os diferentes protocolos de maturação não interferiram (p>0,05) quer com as taxas de maturação quer com as taxas de produção de embriões. A qualidade embrionária foi superior (p=0,004) na fertilização com sêmen fresco (bom: FS=40,1±8,0% vs TS=32,9±5,6%; média: FS=20,1±4,7% vs TS=35,7±5,8%; má: FS=39,8±9,8% vs TS=31,4±7,6%).

Em conclusão, estes resultados preliminares mostram que o sêmen fresco de carneiro pode ser facilmente utilizado para fertilização *in vitro* e melhora a qualidade dos embriões produzidos.

[*In vitro* production of ovine embryos using fresh semen can improve blastocyst quality in Portuguese Merino breed]

Embryo production in sheep is a difficult task demanding experience and expensive facilities, particularly when dealing with *in vivo* embryo production. Easy ways to obtain ovine embryos consist of collecting oocytes at slaughterhouses or systematically pick them up from live animals, allowing a large scale and cheaper *in vitro* embryo production (IVP) for small ruminants. Those are important sources of embryos, oocytes and zygotes for commercial, laboratorial and research proposes, making easier the availability of resources for emerging techniques like cloning or transgenesis. For IVP, several oocyte maturation protocols have been developed using fertilization (IVF) either with fresh or frozen-thawed semen. In Portugal, IVP has been done through IVF using cryopreserved semen because it is easily available for routine use. However, the use of fresh semen could improve embryo production and cryopreservation results.

The aim of this work was to compare the efficiency of *in vitro* embryo production in ovine using different oocyte maturation protocols and fresh or frozen semen for IVF.

Abattoir-derived oocytes (n=1768) were matured in TCM199, 10 µM cysteamine, 10 ng mL⁻¹ EGF, 10 µg mL⁻¹ E2 and gentamicin (mat A, n=692) or plus 10 µg mL⁻¹ FSH and 0.3 mM sodium pyruvate (mat B, n=707) at 39 °C and 5% CO₂ for 22h. Prior to fertilization, either fresh (FS) or frozen/thawed (TS) semen from Merino rams (n=3) was washed or submitted to swim-up respectively. Presumptive zygotes (18h p.i.) were cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) enriched with aminoacids and 6 mg mL⁻¹ BSA at 38.5 °C, under 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ in an humidified atmosphere until the stage of 2-4-8 cell embryos. After assessing cleavage, embryo development proceeded until the blastocyst stage in SOF+BSA and 10% FCS. Quality was evaluated on D6-7 by scoring embryos as good, fair and bad based on IETS guidelines. Data from embryo production rates were analysed using ANOVA. Mann-Whitney U test was used for embryo quality evaluation.

Different maturation protocols did not interfere (P>0.05) either on maturation or on embryo quality or production rates. Embryo quality was higher (P=0.004) when fertilization was accomplished with fresh semen (good: FS=40.1±8.0% vs TS=32.9±5.6%; fair: FS=20.1±4.7% vs TS=35.7±5.8%; bad: FS=39.8±9.8% vs TS=31.4±7.6%).

Preliminary results show that ram fresh semen can be easily used for *in vitro* fertilization and improves the quality of produced embryos.

Expressão do gene prion-like Doppel (*prnd*) ovino em *E. coli*

Pimenta, J.^{1,2}, Dias, F.², Centeno, M.², Mesquita, P.¹, Marques, M.R.³, Batista, M.², Santos, I.C.⁴, Baptista, M.C.¹, Barbas, J.P.¹, Vasques, M.I.¹, Silva Pereira, M.¹, Santos Silva, F.¹, Oliveira Sousa, M.C.¹, Carolino, I.¹, Gama, L.T.¹, Marques, C.C.¹, Horta, A.E.M.¹, Fontes, C.M.², Prates, J.A.², Pereira, R.M.¹

1 INRB, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

3 Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, R. Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

4 Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

Recentemente foi identificado um novo gene denominado Doppel (*prnd*) que apresenta uma interacção com o gene responsável (*prnp*) pela doença priónica (scrapie) dos ovinos. A localização da proteína Doppel (Dpl) nas células de Sertoli e nos espermatozóides associada à esterilidade dos ratinhos mutantes knockout *prnd* (^{o/p}) sugere um papel importante para esta proteína na reprodução masculina.

De forma a estudar este gene nas raças ovinas autóctones foram, numa primeira fase, caracterizados os polimorfismos presentes no gene *prnd* e a sua relação com os polimorfismos no gene *prnp*.

Apenas foi identificado um polimorfismo no codão 26 do gene *prnd* aparentemente implicado na fertilidade ovina. A caracterização da proteína Doppel nesta espécie poderá contribuir para esclarecer qual o papel desta proteína na fertilidade ovina.

No presente trabalho pretendeu-se expressar o gene *prnd* ovino em *E. coli* de forma a obter a proteína Doppel e caracterizar a sua estrutura. Para tal, foi clonado o fragmento otimizado para expressão em *E. coli* contendo a região codificante do gene *prnd* ovino, num vector de expressão, pET21a, com os locais de restrição NheI-XhoI. Para esta ligação foi usada a enzima T4 DNA ligase. Com este vector, foram transformadas as bactérias XL-10 Gold Ultracompetent cells, e o DNA amplificado foi purificado (Miniprep) com o kit comercial NucleoSpin Plasmid. A seguir, foram transformadas bactérias das estirpes Tuner, BL21 e Origami, com as quais foi apenas possível obter uma expressão diminuta. Por este motivo, foram desenhados novos iniciadores de forma a amplificar (polimerase proof-reading, Pfu) dois novos fragmentos. Um deles (Fragmento 2) sem o péptido sinal (PS) e o outro, (Fragmento 1), sem o PS e sem a âncora de Glicosil-Fosfatidil-Inositol (GPI). Estes fragmentos foram primeiro clonados no vector pNZY28, e posteriormente no vector pET21a, com o qual foram transformadas as estirpes Tuner e Origami.

A purificação das proteínas produzidas nestas estirpes (após indução com IPTG), foi efectuada recorrendo a uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado, utilizando uma coluna HiTrap Chelating HP, associada a uma bomba peristáltica Pump P-1. A presença da proteína, confirmada após electroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS, juntamente com um marcador de massa molecular, foi detectada apenas na fase insolúvel.

Foi assim possível detectar uma expressão elevada do fragmento 1 (ao nível da estirpe Origami), o que se encontra de acordo com o previamente descrito relativamente à expressão em *E. coli*, do gene *prnd* do Homem e do ratinho.

[Ovine prion-like Doppel gene (*prnd*) expression in *E. coli*]

Recently, a new gene named Doppel (*prnd*), which presents an interaction with the the *prnp* gene (responsible for the Scrapie disease in sheep), was identified.

The localization of Doppel on both Sertoli cells and spermatozoa associated with *prnd* knockout (^{o/p}) null mutants mice sterility strongly suggests a major role of this protein in male fertility.

In order to study this gene in our local sheep breeds, we first identified it's polymorphisms in these breeds and then established an interaction with the polymorphisms of the *prnp* gene. We only detected one polymorphism at the 26 codon of the *prnd* gene, apparently related with ovine fertility. We are trying to characterize ovine doppel protein in order to understand it's role in sheep fertility.

Afterwards, a fragment of DNA with the full-length *prnd* coding sequence, optimized for expression in *E. coli*, was inserted (with the NheI-XhoI sites) in a prokaryotic-expressing vector pET21a and then transformed firstly into XL-10 Gold Ultracompetent cells and secondly into *E. coli* Tunner, Origami and BL21. As only a small expression was obtained, we decided to design new primers with which we were able to amplify (Pfu, proof reading polymerase) and clone two different DNA fragments. Fragment 2, without the signal peptide (SP) and Fragment 1, without both the Signal Peptide (SP) and the GPI anchor. These fragments were first inserted into the pNZY28 vector and then into the pET21a vector. Tunner and Origami *E. coli* were transformed by this last vector containing our fragments. After IPTG expression induction, and a subsequent purification with the HiTrap Chelating HP system, we only managed to detect a strong expression, as inclusion bodies, from the Origami *E. coli* transformed with fragment 1, as expected after previous studies conducted with the human and mouse Doppel gene.

Criopreservação de sêmen caprino da raça Serrana: comparação entre épocas de congelação e inseminação artificial

Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D., Baptista, M.C., Cavaco Gonçalves, S., Pereira, R.M., Marques, C.C., Vasques, M.I. e Horta, A.E.M.

Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal, INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado (SC) é uma técnica de reprodução essencial ao melhoramento genético das raças autóctones, contribuindo para o aumento da rentabilidade da exploração caprina. A época de congelação e variações individuais dos machos podem ser factores condicionantes da qualidade do SC. Este trabalho teve por objectivo avaliar 1) o efeito de duas épocas (Outono (O) e Inverno (I)) de congelação do sêmen sobre as características seminais; 2) relacionar as características do sêmen descongelado com a fertilidade de cabras inseminadas (IA) na Primavera.

No estudo 1, foram recolhidos 113 ejaculados, por vagina artificial, a 4 bodes de raça Serrana no O (n=74) e I (n=39). O sêmen foi diluído com um diluidor de congelação (TRIS com gema de ovo e glicerol), até uma concentração de 800 milhões de espermatozóides (spz/ml). Após a diluição o sêmen foi refrigerado a 4 °C e congelado em vapores de azoto líquido. No estudo 2, sincronizaram-se 69 cabras serranas com o método ChronoGest® (esponjas vaginais de 45 mg FGA durante 11 dias, 100 µg de cloprostenol -Estrumate® e 500 UI de eCG Intergonan®, 48 horas antes do fim do tratamento progestagénico). As IA foram realizadas 42-45 horas após a remoção das esponjas com uma dose de sêmen (0,25 ml), congelado no Outono. Os resultados foram analisados usando ANOVA/MANOVA e calculados os coeficientes de correlação (n= 107) entre variáveis.

(1) Observaram-se um efeito do bode (P<0,001) e uma interacção época x bode (P<0,04) sobre a mobilidade individual dos spz (MI). As % de spz vivos (P<0,005) e normais (P<0,03) variaram significativamente entre bodes. Verificaram-se efeitos do bode (P<0,005) e da época (P<0,02) (O=40,3 %; I=48,2%) sobre a % de endosmose positivas (EP) aos 25 minutos. Houve um efeito do bode (P<0,001) e uma interacção época x bode (P=0,05) sobre a EP40. A % de anomalias da cauda variou entre bodes (P<0,001).

(2) A fertilidade média foi 46,4% e não diferiu significativamente (P=0,23) entre bodes. Observaram-se correlações positivas significativas (P <0,05) entre a fertilidade e os seguintes parâmetros: MI (0,44), % spz vivos (0,33), % spz normais (0,20), EP5 (0,43), EP25 (0,39) e EP40 (0,50). As anomalias da cabeça correlacionaram-se negativamente com a fertilidade (-0,14; NS).

Em conclusão, identificou-se uma variação individual entre bodes para características seminais importantes que, com excepção da EP25, foi independente da época. A variação entre bodes para a MI é mais acentuada no Outono do que no Inverno. No entanto, esta variação não condicionou a fertilidade. Como esperado, as características seminais acima mencionadas correlacionaram-se significativamente com a fertilidade.

[Buck semen cryopreservation in Serrana breed: comparison of freezing seasons and artificial insemination]

Artificial insemination (AI) with frozen semen (FS) is a reproductive technique essential for the genetic improvement of native breeds contributing to the profitability increase of goat exploitation. Freezing season and male individual variations can be limiting factors of FS quality. This work had two objectives namely (1) to evaluate the effect of two freezing seasons (autumn (A) and winter (W)) upon seminal parameters 2) to correlate frozen/thawed parameters with goat fertility after spring AI. Data were analysed using ANOVA/MANOVA and Pearson's coefficients of correlation (n=107) were calculated among variables.

In work 1) 113 ejaculates from 4 Serrana bucks were collected by artificial vagina (A, n=74; W, n=39). Semen was diluted with a freezing extender (TRIS with egg yolk and glycerol) to give a final concentration of 800 millions sperm cells (spz/ml). After dilution, semen was refrigerated to 4 °C and frozen in nitrogen vapours. In work 2) 69 Serrana goats were synchronized with Chronogest® method (vaginal sponges with 45 mg FGA during 11 days, 100 µg of cloprostenol-Estrumate® and 500 UI of eCG Intergonan® 48 hours before the end of progestagen treatment). AI was performed 42-45 h after sponge removal with a single dose (200 millions spz/0.25 ml) of semen frozen in autumn.

(1) There was a buck effect (P<0.001) and a season x buck interaction (P<0.04) upon individual motility (IM). Live (P<0.005) and normal sperm (P<0.04) were significantly different among bucks. Significant effects of bucks (P<0.005) and freezing season (P<0.02) (A=40.3 %; W=48.2%) were detected upon positive endosmosis (PE) at 25 minutes. There were a buck effect and a season x buck interaction (P<0.05) upon PE40. Sperm tail abnormalities varied among bucks (P<0.001).

(2) Mean fertility was 46.4 % and was not different (P=0.23) among bucks. Significant (P<0.05) positive correlations between fertility and IM (0.44), live sperm (0.33), normal sperm (0.20), EP5 (0.43), EP25 (0.39) and EP40 (0.50) were determined. A negative correlation (-0.14; NS) between fertility and sperm head abnormalities was identified.

In conclusion, individual variations for important seminal traits existed and were season independent, except for EP25. IM variations among bucks were more pronounced in autumn than in winter. However this variation did not influence fertility. As expected, seminal parameters were significantly correlated with fertility.

Diálogo endométrio-embrião na cadela: expressão de integrina $\alpha\beta3$ no endométrio durante o ciclo éstrico e na gestação inicial

Payan-Carreira, R.

CECAV, Universidade de Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real

A implantação está associada ao estabelecimento de uma estreita associação entre o endométrio e o embrião, num processo finamente regulado através da produção de inúmeros factores locais entre os quais de encontram alguns factores de adesão celular, que medeiam as fases iniciais da adesão embrionária. As Integrinas, em particular a integrina $\alpha\beta3$, são moléculas de adesão celular que têm sido associadas, em várias espécies, ao estabelecimento das interações embrio-maternas no período de peri-implantação. Uma alteração na expressão desta molécula tem sido associada ao insucesso da implantação

Neste trabalho, procurou estudar-se o padrão de expressão da integrina $\alpha\beta3$ no endométrio da cadela durante o ciclo éstrico e nas fases iniciais da gestação, recorrendo à técnica da imuno-histoquímica. Fragmentos de útero foram obtidos a partir de peças excisadas em ovariohisterectomias de rotina, tendo sido utilizadas 5 amostras de cada uma das fases do ciclo éstrico da cadela e ainda 5 amostras de úteros gestantes entre os dias 11-16 e 20-24. Das amostras, fixadas em formol tamponado a 10% e incluídas em parafina, foram realizados cortes com 2 μm para a realização de imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase, utilizando-se como anticorpo primário um anticorpo combinado (clone LM609; Chemicon International Inc., CA). A expressão da integrina foi quantificada de acordo com a intensidade da marcação em fraca (+), moderada (++) e forte (+++); foi também avaliado o padrão celular de marcação em apical ou basal.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a integrina $\alpha\beta3$ é expressa de modo constitutivo pelo endométrio da cadela, uma vez que foi encontrada uma marcação ténue ao longo de todas as fases do ciclo. Apesar disso, é de salientar um aumento da expressão desta integrina no epitélio de superfície durante o diestro, sendo sido ainda observado um acréscimo particularmente marcado ao nível do epitélio glandular superficial. Nas fases iniciais da gestação foi possível verificar que a expressão de $\alpha\beta3$ está praticamente ausente do epitélio de superfície, mas que sua expressão se encontra muito aumentada no epitélio glandular superficial. este tipo de padrão de distribuição da expressão de $\alpha\beta3$ parece sugerir uma interação mais íntima entre as membranas embrionárias e as glândulas de superfície do endométrio na implantação da cadela. Foi ainda possível observar que a expressão de Integrina $\alpha\beta3$ é particularmente intensa na trofotoderme embrionária, sendo esta molécula expressa apenas na zona apical externa, que contacta com o endométrio. Este facto indicia uma participação activa do embrião canino, que parece estimular o contacto entre o embrião e o endométrio na implantação.

[Embryo-maternal crosstalk in the bitch: Integrin $\alpha\beta3$ expression in the bitch endometria and in early pregnancy]

Implantation in mammals is a highly coordinated process that aims the establishment of an intimate contact between the embryo and maternal endometria. This phenomena is dependent of a finely tuned ambience, which results from the participation of several local factors. Between them, cell adhesion molecules have been reported to be involved in the initial aposition and adhesion phases. Integrins, particularly integrins $\alpha\beta3$, were proposed to mediate conceptus trofotoderme and the maternal endometrial extracellular matrix during peri-implantation events. A failure in implantation has been associated with defective integrin $\alpha\beta3$ expression.

In this work, we propose to study the expression pattern of integrin $\alpha\beta3$ expression in the bitch endometria and in early phases of pregnancy, using the immunohistochemical technique. Uterine samples were obtained from uteri excise during routine ovariohysterectomy. For each of one the oestrous cycle stages five samples were used; five additional samples were selected from early pregnancies ranging from day 11-16 and from day 20-24. Samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin wax, and sectioned at 2 μm . Immunohistochemical analysis was performed using the avidin-biotin peroxidase method, with a combined primary antibody against $\alpha\beta3$ (clone LM609; Chemicon International Inc., CA). Integrin expression was quantified according to the staining intensity as weak (+), moderate (++) and strong (+++), and the expression pattern was also classified as apical or basal.

$\alpha\beta3$ integrin is constitutively express in the bitch endometria during all stages of the oestrous cycle. Nevertheless, an increase in its expression is detected in the superficial epithelia during dioestrus. In addition, a the increase is particularly notorious in the superficial glands epithelia. During the early stages of pregnancy $\alpha\beta3$ integrin expression almost disappears from the superficial epithelium, but a strong expression is detected on the superficial glands epithelia, suggesting a deeper involvement of the superficial glands in the embryo maternal interaction, in dogs. It was also found that embryonic trofotoderm strongly express integrin $\alpha\beta3$ on its more external layer, in an apical pattern. Such finding points to an active participation of the canine embryo that seems to stimulate the contact with the maternal endometria, in early stages of implantation.

Caracterização de respostas imunitárias à infecção pelo vírus da peste suína africana (VPSA) utilizando o modelo de protecção NHV/L60

Gil, S.¹, Sepúlveda N.², Albina, E.³, Leitão, A.⁴, Martins, C.¹

1 Laboratório de Doenças Infecciosas, CIISA, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; 2 Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras Portugal; Centro de Estatística e Aplicações, Universidade de Lisboa; Escola Superior de Saúde Egas Moniz e Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica; 3 CIRAD, UMR Contrôle des Maladies, Montpellier, F-34398 France; 4 Instituto de Investigação Científica Tropical, CVZ / CIISA, FMV - TULisbon.

Isolados de vírus de peste suína africana (VPSA) de diferente virulência, causam um leque de formas clínicas de doença que variam de hiperagudas, agudas, subagudas a crónicas e inaparentes. Suínos infectados produzem anticorpos detectáveis desde o início da doença e as viremias desenvolvem-se em paralelo com a sua presença. Suínos que sobrevivem a infecção natural com isolados virulentos ou atenuados sobrevivem a contraprova com o vírus homólogo ou com o isolado virulento original pelo que o papel dos mecanismos de imunidade celular na protecção parece ser relevante em virtude dos anticorpos não neutralizarem o poder patogénico do vírus. Nos nossos estudos temos caracterizado mecanismos imunitários face a infecção por VPSA utilizando um modelo de infecção no qual um isolado natural de baixa virulência VPSA/NH/P68 (NHV) protege face a infecção por um isolado de elevada virulência o VPSA/L60 (L60). Neste contexto desenvolvemos entre outros os seguintes estudos:

1) Quantificação de citocinas relevantes IFN α , TNF α , IL12p40, TGF β e de genes de VPSA por PCR em Tempo Real às 2, 4 e 6 horas após a infecção de macrófagos de suíno com NHV e L60. Verificou-se um aumento de expressão de IFN α , TNF α e IL12p40 na infecção por NHV, na qual a expressão de TGF β foi inferior à observada na infecção por L60. Análise dos Componentes Principais demonstrou uma interacção positiva de citocinas envolvidas em mecanismos de imunidade celular, nomeadamente IFN α e IL12p40 na infecção por NHV. Quantificação por ELISA confirmou o aumento de produção de IFN α , TNF α e IL12p40 em macrófagos infectados com NHV.

2) Avaliação da evolução da doença e do perfil de citocinas em suínos inoculados com NHV e contraprovados com L60. Em oposição à morte observada em todos os suínos inoculados com L60, os suínos previamente inoculados com NHV sobreviveram à infecção. PCR em Tempo Real foi realizado para quantificação da expressão de mRNA de citocinas em LMNs de suínos a diferentes dias após a inoculação com NHV e após a contraprova com L60. Resultados demonstraram um aumento da expressão de mRNA de TNF α , IL1 e IL12 após a contraprova com L60 sugerindo uma indução de respostas inflamatórias e uma diferenciação da resposta imune Th1 nos animais contraprovados com L60 que foram previamente inoculados com NHV.

No seu conjunto, os nossos estudos reforçam e clarificam o efeito da infecção por NHV na indução de mecanismos imunitários celulares relevantes para a sobrevivência dos suínos face a infecção por VPSA.

Financiamento: Projecto POCI/CVT/59122/2004, Bolsa FCT/BPD/14676/2003, Welcome Trust Project AHDW/03/04, n°075813 e por CIISA/FMV.

[Characterization of immune responses against African swine fever virus (ASFV) using the NHV/L60 protection model]

African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence have been reported to induce a range of clinical forms of disease varying from peracute, acute, subacute to chronic and unapparent. Infected pigs produce antibodies detectable at the beginning of the disease but viraemia develops in parallel to the high level of antibodies. Moreover pigs surviving natural infection with virulent or attenuated isolates resist challenge inoculation with the homologous and with the originally virulent isolates respectively, although neutralising anti-ASFV antibodies are not detected which emphasizes the role of cellular immune mechanisms in protection. We have pursued characterization of immune mechanisms against ASFV using an infection model in which a naturally occurring low virulent ASFV isolate ASFV/NH/P68 (NHV) enables protection against infection by the highly virulent ASFV/L60 (L60).

With this purpose we have developed among others the following studies.

1) Quantification of relevant cytokines IFN α , TNF α , IL12p40, TGF β and ASFV genes by real time PCR at 2, 4 and 6 hours post infection of porcine macrophages with NHV and L60. Increased IFN α , TNF α and IL12p40 expression was found in infection with NHV in which expression of TGF β was lower than in infection with L60. Principal Component Analysis showed a positive interaction of cytokines involved in cellular immune mechanisms namely IFN α and IL12p40 in the NHV infection. Quantification by ELISA confirmed higher production of IFN α , TNF α and IL12p40 in the NHV infected macrophages.

2) Assessment of disease evolution and cytokine expression in pigs inoculated with NHV and challenged with L60. In opposition to death observed in all pigs inoculated with L60, those previously inoculated with NHV survived infection. Real-time PCR for quantification of cytokine mRNA expression was performed on PBMC collected from pigs at different days post inoculation with NHV and post challenge with L60. Results showed an enhancement of the mRNA of TNF α , IL1 and IL12 after challenge with L60. These results point to an induction of inflammatory responses and a differentiation of a Th1 immune response in animals challenged with L60 that were previously inoculated with NHV.

Overall, our studies reinforce and clarify the effect of the NHV infection by targeting cellular and cellular based immune responses relevant for pig survival against ASFV infection.

This work was supported by the project POCI/CVT/59122/2004, by the post doctoral fellowship FCT/BPD/14676/2003, by the Welcome Trust Project AHDW/03/04, n°075813, and by CIISA/FMV.

Caracterização genética parcial de isolados recentes de campo do myxoma vírus

Muller, A.^{1,2}, Silva, E.^{1,2}, Abrantes, J.³, Esteves, P.J.³, Ferreira, P.G.⁴, Carvalheira, J.C.^{1,3}, Nowotny, N.⁵, Thompson G.^{1,2}

1 Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

2 Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), Universidade do Porto

3 Centro de Investigação de Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), Universidade do Porto

4 Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

5 Zoonoses and Emerging Infections Group, Clinical Virology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine, A-1210 Vienna, Austria

A infecção do coelho Europeu (*Oryctolagus cuniculus*) pelo vírus da mixomatose é um exemplo frequentemente citado de adaptação vírus-hospedeiro e de co-evolução. No seu hospedeiro natural, o tapeti (*Sylvilagus brasiliensis*) na América do Sul, a infecção por este vírus causa doença benigna. No entanto, quando o vírus da mixomatose infecta o coelho Europeu ocorre doença severa com elevada taxa de mortalidade. Assim, para controlar o excessivo número de coelhos bravos, a estirpe de vírus da mixomatose “Moses” foi introduzida na Austrália em 1950 e a estirpe “Lausanne” foi introduzida em 1952 na França, de onde se propagou rapidamente para outros países Europeus. A infecção é actualmente considerada endémica em ambos os continentes. Curiosamente, poucos anos após a introdução do vírus da mixomatose em populações de coelho bravo Europeu, foi observado um decréscimo na morbidade e mortalidade desta doença. Foi então sugerida a hipótese, de que a redução observada nas taxas de caso-fatalidade e no aumento dos tempos de sobrevivência pudessem estar relacionados com a adaptação do vírus ao seu hospedeiro, i.e. com a atenuação do vírus e/ou a selecção natural de coelhos resistentes. No entanto, o conhecimento actual de factores genéticos subjacentes à evolução do vírus da mixomatose e potencialmente à atenuação da sua virulência é limitado.

Para contribuir na elucidação de questões relacionadas com a evolução do vírus da mixomatose nas últimas cinco décadas, seleccionámos nove isolados de campo obtidos no Sul e no Norte de Portugal em 2004/2007, tendo sido utilizada uma estirpe vacinal atenuada (BFAV Riems, Germany) como estirpe de referência. Homogeneizados de pálpebras de coelho bravo com sinais de mixomatose foram inoculados em células RK-13. Foi extraído DNA de culturas celulares inoculadas, após desenvolvimento de efeito citopático. Alguns genes virais seleccionados foram amplificados por PCR e directamente sequenciados. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com sequências disponíveis no GenBank. Foi obtida a sequência parcial de sete genes, compreendendo um total de 3627bp (aproximadamente 2,24% do genoma) dos isolados de campo de mixoma vírus e do vírus de referência. Da análise dos referidos genes, foram detectados 14 polimorfismos nucleotídicos dos quais somente três resultaram em alterações aminoacídicas. Contudo, não foi possível determinar um padrão de alterações genéticas a partir desta análise.

[Partial genetic characterization of recent myxoma virus field isolates]

Myxoma virus infection in the European rabbit is a very frequently cited example of virus-host adaptation and co-evolution. In its natural hosts, the tapeti or brush rabbit (*Sylvilagus brasiliensis*) in South America, myxoma virus infection causes benign disease. In contrast, in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), severe generalized disease with high mortality rates occurs after infection. Thus, to control excessive numbers of wild rabbits, the myxoma virus strain “Moses” was introduced in 1950 into Australia, and myxoma virus strain “Lausanne” was introduced in 1952 into France and from there it rapidly spread to other European countries. The infection is nowadays endemic in both continents. Interestingly, within a few years of the introduction of myxoma virus into naïve European wild rabbit populations a decrease in morbidity and mortality of the disease was observed. The hypothesis arose that the observed decrease of case-fatality rates and increase of survival times could be related to the virus-host adaptation, i.e. to viral attenuation and/or to the natural selection of resistant rabbits.

However, current understanding on genetic factors underlying myxoma virus evolution and potentially attenuation of virulence is limited. To shed further light into the question of myxoma virus evolution within the past five decades, we selected nine field strains from southern and northern Portugal obtained 2004/2007. A live attenuated vaccine strain (BFAV Riems, Germany) was used as reference strain. Homogenates from eyelids from wild rabbits with clinical signs of myxomatosis were inoculated into RK-13 cells. DNA was extracted from cell cultures displaying cytopathic effect. Selected viral genes were amplified by PCR and sequenced directly. The obtained sequences were aligned and compared to sequences available on GenBank. The partial sequences of seven genes totaling 3627bp (approximately 2.24% of the genome) of the myxoma virus field isolates and the vaccine strain were obtained. Within the analysed genes, a total of 14 nucleotide polymorphisms were observed. Of these, only three were nonsynonymous, resulting in an amino acid change. No clear pattern of the genetic changes could be determined.

Caracterização molecular de β -lactamases de amplo espectro em *Escherichia coli* de animais selvagens em Portugal

Poeta, P.^{1,2}, Radhouani, H.^{1,2,3,4}, Gonçalves, A.^{1,2,3,4}, Pinto, L.^{1,2,3,4}, Carvalho, C.^{3,4}, Martins da Costa, P.⁵, Rodrigues, J.^{1,2}, Torres, C.⁶, Igrejas, G.^{3,4}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 2 Centro de Estudos de Ciências Animais e Veterinárias, Vila Real; 3 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 4 Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 5 Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto; 6 Universidad de la Rioja, Espanha

As β -lactamases de amplo espectro (BLLE) são um grupo de enzimas codificadas por genes localizados em plasmídeos, que se encontram disseminados em *Enterobacteriaceae*. O desenvolvimento da resistência antimicrobiana a cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, em bactérias de origem animal, é considerado um grave problema de saúde pública e é maioritariamente devido à produção de BLLE. A maioria das BLLE são derivadas das enzimas clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, através de substituições aminoácidas nas suas seqüências. Contudo, as β -lactamases CTX-M têm cada vez mais vindo a ser descritas em estirpes de origem humana e animal.

O objectivo deste trabalho foi caracterizar os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em todos os isolados de *E. coli* com susceptibilidade reduzida ou resistência a cefalosporinas de largo espectro, obtidos de animais selvagens em Portugal. Os resultados da ocorrência e prevalência de enzimas BLLE em *E. coli* de animais selvagens foram obtidos através da realização das concentrações mínimas inibitórias, do teste da dupla difusão em disco e da detecção genotípica dos genes *bla*, codificadores de BLLE. A caracterização dos entornos genéticos dos genes codificadores de BLLE de origem animal permitiu clarificar as estratégias de mobilização e o seu papel como reservatórios de genes de resistência.

Num estudo realizado pelo nosso grupo de investigação, durante o período de 2003-2004, em animais selvagens provenientes de parques naturais do norte e centro de Portugal, detectámos em nove isolados fecais de *E. coli* (obtidos de veado, coruja, aves de rapina e uma raposa) a presença dos genes codificadores de β -lactamases *bla*_{TEM-52}; *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{SHV-12}. Outro estudo realizado em gaivotas das ilhas das Berlengas revelou em 19% das amostras fecais a presença de genes codificadores de β -lactamases: *bla*_{TEM-52} (8 isolados), *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{OXA-1} (1 isolado), *bla*_{CTX-M-14} (1 isolado), e *bla*_{CTX-M-32} (1 isolado). De referir a elevada frequência do gene *bla*_{TEM-52} em isolados produtores de BLLE com origem em gaivotas (73%) quando comparado com a presença dos genes *bla*_{CTX-M} (27%). Foram detectados entornos genéticos diferentes nos genes *bla*_{CTX-M}. A seqüência do fragmento obtido por PCR e posteriormente sequenciado, revelou num isolado, a presença de uma região da transposase IS26 a montante do gene *bla*_{CTX-M-1} flanqueado pelo *ISEcp1* e seguido por uma região intergénica. Noutro isolado, a presença das seqüências de inserção *ISEcp1* e *IS903* foram identificadas envolvendo o gene *bla*_{CTX-M-14} e, o entorno genético detectado num isolado com o gene *bla*_{CTX-M-32}, incluiu a *ISEcp1/IS5* a montante e o *orf477* a jusante do gene *bla*.

[Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* of wild animals in Portugal]

ESBLs are a group of enzymes encoding by genes described on plasmid that are spread among *Enterobacteriaceae*. The development of antimicrobial resistance to 3rd and 4th generation cephalosporins in bacteria of animal origin is considered a major public health problem and is mainly due to the production of ESBL. Most ESBLs are derived from the classical TEM-1, TEM-2 and SHV-1 enzymes, by amino acid substitutions in their sequences, but CTX-M β -lactamases are increasingly being reported among human and animal *E. coli* strains.

The objective of this work was to characterize the beta-lactam resistance mechanisms in all *E. coli* isolates with reduced susceptibility or resistance to expanded-spectrum cephalosporins, recovered from wild animals in Portugal, and to analyse their clonal relationship. Data on the occurrence and prevalence of ESBLs enzymes in *E. coli* strains of wild animals was obtained by microdilution synergy confirmatory tests and genotypic detection of ESBLs *bla* genes. Characterization of the genetic environment of ESBLs genes of animal origin will clarify their mobilization strategies and the role of animals as putative reservoirs of resistance genes. Assessment of clonal relatedness between the different ESBLs producer strains of animal origin reveal the potential impact on human and animal health.

In one study performed by our group during the period 2003–2004 in wild animals from Natural Parks located in the north or centre of Portugal we detected in nine isolates from deer, owl, birds of prey and one fox the presence of the *bla*_{TEM-52}; *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM-1}; *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{SHV-12} encoding beta-lactamase genes. Another study performed in seagulls of Berlengas island revealed in 19% of the faecal samples studied the presence of the beta-lactamase genes: *bla*_{TEM-52} (8 isolates), *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{OXA-1} (1 isolate), *bla*_{CTX-M-14} (1 isolate), and *bla*_{CTX-M-32} (1 isolate). It is interesting to remark that high frequency of *bla*_{TEM-52} gene among ESBL-positive isolates from seagulls (73%), respect to *bla*_{CTX-M} genes (27%). Different genetic environments were detected surrounding the *bla*_{CTX-M} genes. The sequence of the fragment obtained by PCR upstream of the *bla*_{CTX-M-1} gene in one *E. coli* strain revealed the presence of a region of the IS26 transposase flanking a partially truncated *ISEcp1* followed by an intergenic region. The presence of *ISEcp1* and *IS903* was identified surrounding the *bla*_{CTX-M-14a} gene in another *E. coli* and the genetic environment of the *bla*_{CTX-M-32} gene detected in an *E. coli* strain included the *ISEcp1/IS5* upstream and the *orf477* downstream of *bla* gene.

Antibiorresistência da microflora fecal de lontra (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) em Portugal

Oliveira, M.¹, Pedroso, N.², Sales-Luís, T.², Tavares, L.¹ e Vilela, C.L.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Centro de Biologia Ambiental, Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

A antibiorresistência é um importante factor de virulência bacteriana, muitas vezes adquirido através de microrganismos ambientais ou da microbiota normal do hospedeiro. A monitorização do perfil de antibiorresistência em isolados de animais silvestres fornece informação relevante sobre o grau de contaminação ambiental e sobre o potencial risco que estes animais representam como veículos de disseminação de determinantes de resistência a antibióticos.

Neste estudo foi avaliado o perfil de resistência a agentes antimicrobianos de *Escherichia coli* (n=7) e *Enterococcus* spp. (n=26) isolados a partir de 35 amostras de fezes de lontra (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758), recolhidas nas barragens de Pego do Altar e Monte Novo e troços fluviais associados, localizados no Alentejo. Os 12 compostos antimicrobianos testados segundo as normas do "Clinical and Laboratory Standards Institute" possuem modos de acção distintos, actuando através da inibição da tradução (n=6), da síntese da parede celular (n=4), da acção da DNA girase (n=1) ou da síntese do folato (n=1).

Os dois géneros bacterianos apresentaram níveis de resistência distintos. Todos os isolados de *E. coli* foram susceptíveis a 5 agentes antimicrobianos. Todos os isolados eram resistentes à cefalexina, cefotaxime, enrofloxacin e estreptomycin. Todas as bactérias, à excepção de um isolado de *E. coli*, apresentaram um perfil de multiresistência, definida como a resistência a agentes antimicrobianos com modos de acção distintos.

É pouco provável que as amostras proviessem de animais sujeitos a antibioterapia, o que sugere que os níveis de antibiorresistência observados não se devam a exposição prévia a fármacos antimicrobianos, factor ainda considerado como a causa principal para a emergência, selecção e disseminação de bactérias resistentes. O perfil de multiresistência encontrado sugere que a exposição da microbiota intestinal a agentes antimicrobianos presentes no ambiente pode seleccionar estirpes resistentes, embora não sejam de excluir a ocorrência de mutações pontuais ou a aquisição de elementos móveis de DNA.

O perfil de antibiorresistência de *E. coli* e *Enterococcus* spp. isolados de amostras de fezes de lontra pode contribuir para a avaliação ambiental em termos de contaminação microbiana pelo Homem e animais domésticos e silvestres. Estes dados devem ser levados em consideração no estabelecimento de planos para a gestão e conservação de lontra, especialmente em locais onde a densidade de gado perto de sistemas aquáticos seja elevada ou onde ocorram actividades recreativas.

[Evidence of antimicrobial resistance in Eurasian otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) fecal bacteria in Portugal]

Antimicrobial resistance is an important bacterial virulence factor, often acquired through environmental microorganisms or deriving from the host commensal microbiota. The monitorization of the antimicrobial resistance profile in bacteria isolated from wild animals provides relevant information about environmental contamination and the potential role of these animals as vectors of resistance determinants dissemination.

In this study we evaluated the antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* (n=7) and *Enterococcus* spp. (n=26) isolates obtained from 35 fecal samples from Eurasian otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) free-living in Pego do Altar and Monte Novo reservoirs and associated river stretches in Alentejo region. The 12 antimicrobials, tested as recommended in the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, belonged to different antimicrobial drug classes, acting through inhibition of transduction (n=6), cell wall synthesis (n=4), DNA gyrase (n=1) and folate synthesis (n=1).

Susceptibility levels were different for the two bacterial genera considered. All *E. coli* isolates were susceptible to 5 of the antimicrobials tested. All enterococci were resistant to cephalexin, cefotaxime, enrofloxacin and streptomycin. With exception of one *E. coli* isolate, all bacteria presented a multiresistant profile, being resistant to more than one antimicrobial drug class.

The animals sampled were not likely to have been subject to antibiotherapy, suggesting that the antimicrobial resistance levels observed are not due to previous exposure to antimicrobial drugs, which is still considered the major cause of emergence, selection, and dissemination of resistant bacteria. The multiresistant profile found in most isolates supports the hypothesis that exposure of intestinal microbiota to environmental antimicrobial agents may select for resistant bacterial strains, but the occurrence of point mutations or acquisition of transmissible mobile DNA elements responsible for antimicrobial resistance must also be considered.

The antimicrobial resistance profile of *E. coli* and *Enterococcus* spp. isolates from otters' fecal samples may contribute to the evaluation of the environmental microbial contamination by humans and domestic and wild animals. These data should be taken upon consideration in future plans regarding otter management and conservation, particularly in environments where cattle density near aquatic systems is high or where outdoor recreational activities take place.

Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de infecções entéricas e sistêmicas de animais de produção

Baptista, B. e Pomba, C.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Objectivos: O nosso estudo tem como objectivo a caracterização da susceptibilidade e dos mecanismos moleculares de resistência às fluoroquinolonas em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de infecções colibacilares entéricas e sistêmicas de bovinos, suínos e aves.

Metodologias: Os padrões de susceptibilidade à enrofloxacin, marbofloxacin, orbifloxacin e ciprofloxacin foram determinados para 530 estirpes de *E. coli* isoladas de bovinos (n=102), de suínos (n=364) e de aves (n=64). Foram estudadas no total 42 estirpes provenientes de suínos (n=18), bovinos (n=21) e de aves (n=3), com valores de CIM superiores a 32 µg/ml à ciprofloxacin com o objectivo de caracterizar as mutações presentes nos genes codificantes das topoisomerases II e IV. Para a pesquisa do gene *qnrA* por PCR foram analisadas 142 estirpes de *E. coli* (n=142) provenientes de suínos (n=79), bovinos (n=43) e de aves (n=20). A pesquisa do gene *qnrA* por hibridação ADN-ADN foi feita na totalidade das estirpes em estudo (n=530).

Resultados: Os padrões de susceptibilidade revelaram valores elevados de resistência para todas as fluoroquinolonas sendo que, apenas a enrofloxacin está licenciada em Portugal para uso em todos estes animais. Todas as estirpes apresentaram mutações que conferiram substituições aminoácidas nas subunidades GyrA (posições 83 e 87) e ParC (posição 80). Não foi observada uma correlação directa entre valores de CIM mais elevados e um maior número de mutações nos genes *gyrA*, *parC*, *parE* e *gyrB*. Nos diferentes métodos utilizados não foi detectada a presença do gene *qnrA* nas estirpes de *E. coli* isoladas de animais. O nosso estudo revelou níveis de resistência preocupantes às fluoroquinolonas nas estirpes de *E. coli* isoladas de infecções colibacilares entéricas e sistêmicas de bovinos, suínos e aves em Portugal. O efeito aditivo das mutações cromossómicas dos genes constitutivos codificadores das topoisomerases II e IV são determinantes na aquisição de resistência às fluoroquinolonas embora outros mecanismos deverão estar associados nas estirpes que apresentam elevados valores de resistência. O presente estudo demonstrou a ausência de mediação plasmídica pelo gene *qnrA* na resistência às fluoroquinolonas em estirpes clínicas de *E. coli* de origem animal em Portugal.

[Fluoroquinolones resistance mechanisms in lineages of *Escherichia coli* isolated from enteric and systemic infections of animal origin]

Objectives: The aim of this study is the characterization of the susceptibility and the molecular mechanisms of resistance to fluoroquinolones in lineages of *Escherichia coli* isolated of enteric and systemic infections of bovines, swines and birds.

Methodologies: The susceptibility patterns to the enrofloxacin, marbofloxacin, orbifloxacin and ciprofloxacin of 530 strains of *E. coli* isolated of bovine (n=102), of pigs (n=364) and of poultry (n=64) were determinate. We studied a total of 42 strains originating from pigs (n=18), bovine (n= 21) and of poultry (n=3), with values of CIM over 32 µg/ml to ciprofloxacin with the purpose of characterizing chromosomal mutations in the constitutive genes that codify topoisomerases II and IV. The detection of the *qnrA* gene was done by PCR in 142 strains of *E. coli* isolated from pigs (n=79), bovine (n=43) and poultry (n=20). The search of the *qnrA* gene was done by DNA-DNA hybridization in the total of the strains in study (n=530).

Results: The susceptibility patterns revealed elevated values of resistance for all the fluoroquinolones being that, only enrofloxacin is licensed in Portugal for use in all of these animals. All the strains presented mutations that conferred aminoacidic substitutions in the subunits GyrA (positions 83 and 87) and ParC (position 80). It was not observed a direct correlation between the more elevated values of CIM and a higher number of mutations in the genes *gyrA*, *parC*, *parE* and *gyrB*. The additive effect of the chromosomal mutations of the constitutive genes that codify topoisomerases II and IV are determinant in the acquisition of resistance to the fluoroquinolones although others mechanisms should be associated in the strains that present elevated values of resistance. The present study revealed the absence of plasmid mediation by *qnrA* gene in fluoroquinolone resistance among clinical *E. coli* strains of animal origin in Portugal.

Mecanismos de resistência às quinolonas em *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC

Antunes, N.T.^{1,3}, Poveda, J.B.¹, Assunção, P.¹, Rosales, R.S.¹, Tavío, M.M.²

¹ Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva, Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Spain

² Microbiología, Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Medicina, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

³ Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra

Os mecanismos de resistência às quinolonas encontram-se bem documentados em diversas espécies de *Mycoplasma*; contudo, não existem dados referentes a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, um dos agentes etiológicos da agalaxia contagiosa. O propósito do nosso estudo foi a selecção de mutantes resistentes às quinolonas e a determinação do efeito de mutações nas topoisomerasas e dos sistemas de efluxo.

Seleccionaram-se mutantes utilizando diversas quinolonas como agentes selectores. As susceptibilidades a fluoroquinolonas e outros antimicrobianos não relacionados foram determinadas na presença e ausência de inibidores e sistemas de efluxo. Estudou-se o padrão das proteínas de membrana. Amplificou-se e sequenciou-se as regiões determinantes de resistência às quinolonas dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*.

Detectaram-se doze substituições de aminoácidos devidas a mutações nos 4 genes e um aumento na susceptibilidade às quinolonas quando se utilizaram inibidores de sistemas de efluxo dependentes do ATP, mas não quando se utilizaram inibidores dos sistemas de efluxo dependentes de prótons. Duas proteínas demonstraram um aumento na sua expressão nos mutantes seleccionados com quinolonas.

Em conclusão, as substituições de aminoácidos desempenham um papel importante na selecção de resistência às quinolonas. Também existe evidência do envolvimento de um sistema de efluxo do tipo ATP dependente na resistência às quinolonas. As proteínas cujo aumento de expressão foi identificado poderão ser proteínas de efluxo; contudo, mais estudos deverão ser realizados.

[Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC: target mutations and active efflux]

Quinolone resistance mechanisms are well documented in several *Mycoplasma* species; however, there are no previous reports on *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, one of the causative agents of contagious agalactia. The aim of our study was to select for quinolone resistant mutants and to determine the effect of topoisomerase mutations and efflux systems.

The mutants were obtained by multistep selection using several fluoroquinolones as selective agents. The susceptibilities to fluoroquinolones and non related antimicrobials were determined, in the presence and absence of efflux system inhibitors. The membrane protein pattern was also studied. A PCR amplification and DNA sequencing of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* quinolone-resistance determining regions (QRDR) were made to characterize the mutants and the parental strains.

Twelve different aminoacid substitutions due to mutations were seen in *gyrA*, *parC*, *parE* and *gyrB* genes. An increased susceptibility to quinolones was seen when determined in presence of ATP-dependent efflux system inhibitors, but not when proton-dependent efflux inhibitors were used. Two proteins evidenced an increased expression in mutants selected with several fluoroquinolones.

In conclusion aminoacid substitutions played a role in quinolone resistance. There was also evidence of an ATP-dependent efflux system related with quinolone resistance. The identified proteins with an increased expression might be related to efflux proteins; however, further studies must be made.

Qualidade e Segurança Alimentar

Comunicação por convite

Restauração colectiva – “cook-chill” e “cook-freeze”

Henriques, Ana Rita Sá

Plano Consultores Lda

O consumidor actual procura, cada vez mais, alimentos sensorialmente apelativos, que sejam fáceis de preparar e usar, nutricionalmente superiores e de longa duração. Tal facto condiciona um aumento da procura de refeições minimamente processadas, quer pelo consumidor final, quer pelos retalhistas. As refeições prontas a consumir são também cada vez mais usadas em hospitais e lares de idosos, onde a população alvo é, na sua maioria, imuno-comprometida. Simultaneamente, o consumidor procura alimentos minimamente processados, com menos aditivos e conservantes. Estas exigências do consumidor, aparentemente incompatíveis, requerem da indústria alimentar uma intensa optimização do processo produtivo e uma abordagem inovadora.

Nos últimos 30 anos, foram desenvolvidos vários tipos de processamento alimentar, tais como o “cook-freeze” e o “cook-chill”. Estes métodos permitem aumentar a vida útil dos alimentos, através da combinação de um processamento térmico minimalista, seguido de um arrefecimento rápido e armazenamento a baixas temperaturas, mas sem recorrer à adição de conservantes ou aditivos. Os métodos “cook-chill” e “cook-freeze” têm por base uma combinação propositada de barreiras individuais, geralmente aplicadas sequencialmente, que previne o crescimento de patogénicos e garante a segurança microbiológica do produto. Como o tratamento térmico não é suficiente para garantir a esterilidade comercial do alimento, existe um potencial para a sobrevivência e crescimento de diferentes patogénicos, sobretudo se ocorrer um desvio aos limites estabelecidos numa etapa do processamento. Deste modo, são microrganismos importantes nestes métodos os que sobrevivem ao tratamento térmico e os que conseguem desenvolver-se em refrigeração.

Por outro lado, muitas são as vantagens industriais apontadas aos métodos “cook-chill” e “cook-freeze”, sendo a poupança de recursos a mais referida. Esta poupança advém da redução dos custos energéticos devido à optimização da utilização dos equipamentos e diminuição dos picos de volume de trabalho. Contudo, a falta de aperfeiçoamento destas tecnologias nos pequenos produtores, a pressão comercial e logística para aumentar a vida útil dos produtos, a necessidade de uma distribuição refrigerada, o desrespeito pela cadeia do frio (na venda a retalho e no consumidor final) e a existência de numerosas barreiras técnicas e dificuldades práticas na implementação do sistema HACCP pelas empresas do sector alimentar contribuem para potenciais falhas na segurança destes produtos.

Portanto, a implementação dos métodos “cook-chill” e “cook-freeze” na indústria alimentar deverá ser precedida de extensa discussão e reflexão sobre algumas questões de natureza higio-sanitária e económica.

[Cook-chill and cook-freeze methods in food service]

Nowadays, consumers demand for increasingly appealing foods, easy to prepare and use, nutritionally balanced and with long shelf-life. This determines an increase in demand for minimally processed meals by the final consumer and retailers. Ready to eat meals are also increasingly used in hospitals and senior housing, where the population is majority of immuno-compromised.

At the same time, consumer demand for minimally processed food with fewer additives and preservatives. These consumer demands, seemingly incompatible, require from the food industry an intense optimization of production process and an innovative approach.

Over the last 30 years, various food processing types were developed, such as "cook-freeze" and "cook-chill". These methods may increase food shelf life, through a combination of soft thermal processing followed by rapid cooling and storage at low temperatures, but without the addition of preservatives or additives. The "cook-chill" and "cook-freeze" methods are based on a deliberate combination of individual barriers, usually applied sequentially, to prevent pathogens growth and to assure microbiological safety of the product. As the heat treatment is not sufficient to ensure the sterility of the food product, there is potential for survival and growth of different pathogens, especially if there is a limit deviation in a processing stage. Thus, for these methods, the important microorganisms are those that survive the heat treatment and those that are able to grow in refrigeration temperatures.

From another standpoint, there are many industrial advantages in the "cook-chill" and "cook-freeze" methods and the saving of resources is the most mentioned. These savings come from the reduction of energy costs due to optimal use of equipment and reduction of workload peaks.

However, the lack of improvement of these technologies on small producers, logistic and commercial pressure to increase product shelf life, the need for a refrigerated distribution, the cold chain disregard and a large number of technical barriers and practical difficulties in implementing the HACCP system on food businesses contribute to potential flaws in the safety of these products.

Therefore, the implementation of "cook-chill" and "cook-freeze" methods in the food industry should be preceded by extensive discussion and reflection on hygienic and economic concerns.

Microrganismos emergentes com impacto na Saúde Pública

Fraqueza, Maria João

CIISA, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; mjoaofraqueza@fmv.utl.pt

A incidência global de doenças de origem alimentar é difícil de estimar, tendo sido relatado pela Organização Mundial de Saúde que só em 2005 morreram de doenças gastro-intestinais cerca de 1,8 milhões de pessoas. Um dos grandes compromissos das políticas mundiais de saúde é reduzir as doenças de origem alimentar.

Os microrganismos emergentes relacionados com doenças de origem alimentar, são aqueles que dominam presentemente as discussões científicas e que constituem preocupação para os técnicos de controlo de qualidade e segurança alimentar. A avaliação de um dado microrganismo como risco emergente, passa pela detecção precoce de factos relacionados com esse perigo através de dados de investigação científica, programas de monitorização ou observações episódicas. Muitos dos chamados patogénicos emergentes já são nossos velhos conhecidos mas presentemente são favorecidos por mudanças ambientais e que aliadas à sua capacidade para adaptarem a actividade de acordo com as influências externas, os tornam sem dúvida numa história de sucesso em detrimento de sistemas de segurança alimentar. Os factores que estão na base da emergência de alguns microrganismos prendem-se com o aumento do comércio de alimentos a nível global e mudanças de mercados que propiciam exposição a novos riscos, aumentando as consequências na ocorrência de um surto de doença de origem alimentar. Aliam-se ainda outros factos tais como mudanças de hábitos alimentares dos consumidores, aparecimento de novas práticas de produção, tecnologias e produtos alimentares, alterações na população cada vez mais envelhecida e o aumento de indivíduos imunocomprometidos.

Tal como em anos anteriores, em 2005 na União Europeia a causa mais comum de surtos de doença de origem alimentar foi a *Salmonella* spp.. Ovos e produtos derivados foram frequentemente apontados como fonte de infecção, mas a carne de frango e produtos cárneos também são fontes frequentes. O ambiente doméstico e os restaurantes são os locais onde é mais frequente a exposição à *Salmonella* spp.. A segunda causa mais identificada de surtos, foi o *Campylobacter* spp.. A carne de frango é citada como a maior fonte de infecção. Contudo, surtos envolvendo um maior número de indivíduos foram causados por água contaminada. Outras importantes causas de doenças de origem alimentar são os vírus (6% de todos os surtos), toxinas bacterianas (*Staphylococcus* spp. (3%), *Clostridium* spp. (2%) e *Bacillus* spp. (1%)), *E. coli* patogénica (1%), *Shigella* (1%) e *Giardia* (1%). Em Portugal existem poucos dados disponíveis para avaliação das fontes de infecção mais comuns e respectiva probabilidade de exposição para a *Salmonella* spp. mas não há qualquer informação no que diz respeito ao *Campylobacter* spp. Apresentamos os resultados obtidos no projecto CampEC-NET (ERA-FOOD/0001/2006).

Os microrganismos patogénicos emergentes continuarão a ter no futuro grande influência nas práticas de sistemas de gestão de segurança alimentar integrados desde a produção, indústria até à distribuição e consumo. A prevenção dos microrganismos emergentes na produção primária de alimentos através de boas práticas é fundamental, assim como, a comunicação de informações relacionadas com as boas práticas de confeção dos alimentos ao consumidor é muito importante na prevenção de doenças de origem alimentar.

[Emerging microorganisms with impact on Public Health]

The global incidence of foodborne diseases is difficult to estimate, but it has been reported by World Health Organization that in 2005 alone 1.8 million people died from diarrhoeal diseases. One main commitment of global health policy is to reduce foodborne diseases.

Emerging microorganisms related to foodborne diseases are those that presently dominate the scientific discussions and are the main concern of food quality and safety control technicians. The evaluation that a particular microorganism is an emerging risk is done by early detection of facts related with this hazard such as data from scientific research, surveillance programs and episodic observations. Most of the named emerging microorganisms have been about for a long time but favoured by changes in environmental factors and abilities to modify their activities according to external influences, they provide a history of success for the microbe on the expense of food safety systems. The factors that influence the emerging of some microorganisms are related to the global food trade growth and food marketing changes that lead to exposure to new risks and greater potential consequences of foodborne illness outbreaks. Other facts are added such as the changing of consumer eating habits, new production practices, technologies and products, ageing of the population and the increased number of immunocompromised individuals.

As in previous years, the most common cause of reported outbreaks in the EU in 2005 was *Salmonella* spp.. Eggs and egg products were most frequently associated with *Salmonella* spp. outbreaks, but broiler meat and meat products were also found as common sources. Private homes and restaurants were the most commonly reported locations of exposure to *Salmonella* spp.. The second most common cause of outbreaks was *Campylobacter* spp. The broiler meat remained the major source of infection. However, *Campylobacter* spp. outbreaks involving the most cases were caused by contaminated drinking water. Other important causes of foodborne outbreaks were viruses (6% of all outbreaks), bacterial toxins (i.e. *Staphylococcus* spp. (3%), *Clostridium* spp. (2%) and *Bacillus* spp. (1%)), pathogenic *E. coli* (1%), *Shigella* (1%) and *Giardia* (1%).

In Portugal, the data available for food attribution covering source tracking and risk exposure to *Salmonella* spp. is scarce and there is no information concerning *Campylobacter* spp. Results from the project CampEC-NET (ERA-FOOD/0001/2006) are presented.

The emerging pathogens will continue in the future to have a major influence on the practices of integrated food safety management from production to distribution and consume. The emerging microorganisms prevention on primary production through good practices is fundamental. As well, the communication to consumers regarding the good practices of food manipulation and preparation is crucial for foodborne diseases prevention.

Antibioresistências em *Enterobacteriaceae* isoladas em produtos de IV Gama

Delgado, V.¹, Gonçalves, R.¹ e Brandão, C.²

1 ETGI polo Sintra

2 Laboratório de Microbiologia Alimentar, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

Objectivos: Neste projecto foram analisadas 30 saladas de vegetais de IV Gama de variados ingredientes e marcas, tendo sido pesquisados e quantificadas bactérias do grupo das *Enterobacteriaceae*, importantes em termos evidência de más práticas de desinfeção. Todos os isolados obtidos foram submetidos a testes de sensibilidade aos antibióticos.

Metodologias: A pesquisa e quantificação de *Enterobacteriaceae* foi realizada utilizando VRBG, posteriormente realizaram-se testes bioquímicos de confirmação, tendo-se também realizado o teste de API 20 E, a todos os isolados antibioresistentes obtidos.

A resistência aos antibióticos foi testada em relação a 112 isolados pelo método de Kirby-Bauer tendo-se utilizado os seguintes antibióticos: Amoxicilina+Ácido Clavulânico (AMC); Ampicilina (AM); Cefotaxime (CTX); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CM); Estreptomicina (S); Gentamicina (GM); Imipenem (IPM); Nitrofurantroína (F/M); Tetraciclina (TC); Trimetoprim e sulfametoxazol (SxT).

Resultados: verificou-se que 58% dos isolados eram antibioresistentes, distribuídos por 41 perfis de antibioresistência; 67,7% resistências simples e 32,3% resistências múltiplas. Das estirpes com resistências múltiplas, 38,1%, 33,33%, 9,52%, 14,29%, 4,8%, eram resistentes a, respectivamente, 2, 3, 4, 5 e 6 antibióticos.

Dos antibióticos testados, aquele que evidenciou a mais elevada taxa de antibioresistência foi a AM, seguido do CTX e da AMC. Os que se revelaram mais eficazes foram, respectivamente, IPM, CAZ e TE.

Com este trabalho pode-se verificar que apenas 13% das amostras apresentavam níveis de contaminação satisfatórios, ≤ 102 ufc/gr, sendo as restantes amostras consideradas aceitáveis e não satisfatórias.

[Antibioresistance in *Enterobacteriaceae* isolated in ready-to-eat salads]

Objectives: This project has studied a sample of 30 ready to eat vegetable salads of varied ingredients and brands. We have researched and quantified the group of *Enterobacteriaceae* bacteria, as an indicator of bad hygiene practice. Every sample was submitted to antibiotic sensitivity tests.

Methods: The research and quantification of *Enterobacteriaceae* was performed using VRBG. We also performed further tests for biochemical confirmation, and all the antibioresistent isolates obtained have been tested in the API 20 E.

The resistance to antibiotics was tested in relation to 112 isolates by the method of Kirby-Bauer and the following antibiotics were used: Amoxicillin + Clavulanic acid (AMC), ampicillin (AM), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), Ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CM), Streptomycin (S), gentamicin (GM), imipenem (IPM); Nitrofurantroína (F/M), Tetracycline (TC); Trimethoprim and sulfamethoxazole (SxT).

Results: We found that 58% of the isolates were antibioresistent, distributed by 41 profiles of antibioresistance; 67.7% simple resistance, and 32.3% multiple resistance. Regarding the multiple resistant isolates, 38.1%, 33.33%, 9.52%, 14.29%, 4.8%, were resistant to, respectively, 2, 3, 4, 5 and 6 antibiotics.

Of the antibiotics tested, AM, showed the highest rate of antibioresistance, followed by CTX and the AMC. Those that have proved most effective were, respectively, IPM, CAZ and TE.

This work shows that only 13% of the samples had satisfactory levels of contamination, ≤ 102 ufc/gr, and the remaining samples are acceptable but not satisfactory.

Detecção de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas em pó: implementação da metodologia ISO/TS 22964:2006

Assunção, R.¹, Correia, C.², Furtado, R.², Santos, M.², Novais, M.², Ferreira, M.³

1 Médico Veterinário

2 Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Surtos graves ocorridos na década de 90 em lactentes, sobretudo com idade inferior a um ano, na sequência do consumo de fórmulas lácteas infantis em pó, levaram ao reconhecimento de uma bactéria, *Enterobacter sakazakii* pertencente à família das Enterobacteriaceae, como um agente patogénico emergente. Actualmente, este microrganismo é considerado um perigo severo para populações restritas, nas quais pode causar sequelas graves, estados mórbidos de longa duração ou a morte. Dado que em Portugal o conhecimento relativo às infecções causadas por este microrganismo e os estudos realizados neste tipo de alimentos são escassos, é fundamental dispor de metodologias de detecção laboratorial específicas e fiáveis.

Este estudo realizou-se no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), em Lisboa, entre Setembro de 2007 e Fevereiro de 2008, tendo como principais objectivos a implementação da metodologia de detecção de *E. sakazakii* em fórmulas lácteas em pó, de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006, e a comparação da eficiência e da capacidade de recuperação de três meios de cultura cromogénicos diferentes disponíveis no comércio: ESIA (Laboratoire AES), DFI (Oxoid) e ChromoCult (Merck). Para efectuar a implementação deste método, utilizou-se como matriz de ensaio uma amostra de uma fórmula infantil em pó, subdividida em 60 alíquotas, avaliada previamente quanto à ausência de *Enterobacteriaceae*, as quais foram contaminadas artificialmente e com diferentes níveis de uma estirpe de referência de *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329.

Os meios de cultura DFI e ChromoCult evidenciaram os melhores resultados, quando comparados com o meio ESIA. Assim, verificou-se que com níveis de inoculação de 10 ufc/placa, se obteve no meio ESIA uma recuperação de 56%, valor inferior ao revelado pelos meios DFI e ChromoCult (86%). Para níveis de inoculação superiores a 10 ufc/placa, os meios DFI e ChromoCult apresentaram sempre uma percentagem de recuperação de 100%. No meio ESIA obtiveram-se percentagens de recuperação de 77% e 63%, com níveis de inoculação de 10-99 ufc/placa e superiores a 100 ufc/placa, respectivamente. Nestes ensaios, verificou-se também que no meio ESIA, sempre que ocorreu crescimento de *E. sakazakii*, o mesmo se revelou muito reduzido ou mesmo escasso quando comparado com o evidenciado nos outros dois meios de cultura. Este trabalho evidencia a necessidade de se realizarem ensaios analíticos adicionais com o objectivo de comprovar a menor recuperação com o meio cromogénico preconizado pela norma ISO e permitiu a implementação de uma nova metodologia, a qual é de fulcral importância para o INSA de forma a responder cabalmente a eventuais ocorrências e/ou solicitações relacionadas com toxinfecções alimentares causadas por microrganismos patogénicos emergentes.

[Detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulas: implementation of the method ISO/TS 22964:2006]

Studies developed in the 90 years in powder milk formulas, were able to identify *Enterobacter sakazakii* of the family Enterobacteriaceae as an etiologic agent involved in foodborne infections, affecting specially infants and so considered an emergent pathogenic. This microorganism is now considered a severe hazard to a restricted population, and can cause serious or chronic sequelae, morbid states of long duration or death. Due to the fact that in Portugal the knowledge regarding the occurrence of this microorganism in this type of food is scarce, it is of extreme importance to implement accurate detection methods.

This study was conducted in the National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge (INSA), in Lisbon, between September 2007 and February 2008 and the purposes were the implementation of a detection method for *E. sakazakii* in powder milk formulas, according to the standard ISO/TS 22964:2006, and the comparison of the efficiency and recovery of three different chromogenic media ESIA (Laboratoire AES), DFI (Oxoid) and ChromoCult (Merck). We used a reference strain of *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329 and as food matrix a sample of an infant formula for suckles subdivided in 60 portions, which was free of *Enterobacteriaceae*.

The DFI and ChromoCult were the media that gave the most reliable results, when compared with the ESIA medium. It was verified, in the performed assays, that with an inoculation level of 10 cfu/plate, the ESIA medium presented a recovery percentage of 56%, which was a lower value when compared with both DFI and ChromoCult media (86%). With inoculation levels above 10 cfu/plate, the DFI and ChromoCult media presented a recovery percentage of 100%, whereas the ESIA medium showed recovery percentages of 77% and 63%, with inoculation levels of 10-99 cfu/plate and higher than 100 cfu/plate, respectively. In these assays it was also verified that in the ESIA medium, whenever it has occurred growing of the *E. sakazakii*, the same was very reduced or scarce when compared with the growing observed in the other two media. Since INSA is the National Reference Laboratory for health, it is of extreme importance as a matter of fact to develop additional analytic assays with the intent to prove the lesser recovery with the chromogenic medium praised by the ISO standard and the implementation of new methodologies for emergent pathogens in order to promptly answer to eventual occurrences and/or solicitations concerning suspected foodborne illnesses.

Delimitação de processos de pasteurização em alimentos de baixa acidez refrigerados

Silva, F.V.M.¹, Gibbs, P.A.²

1 INRB IP, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal

2 Leatherhead Food International, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, UK

O crescente consumo de alimentos minimamente processados e refrigerados está relacionado com um aumento no número de toxinfecções alimentares, levando assim ao aparecimento de novas preocupações com a saúde pública. A pasteurização do alimento pela aplicação de calor na ordem dos 65-95 °C, reduz o número de microrganismos patogénicos e de outros micróbios que podem deteriorar o alimento. Relativamente aos alimentos de baixa acidez (pH>4,6), os esporos dos microrganismos que sobrevivem à pasteurização têm que ser controlados pela utilização da refrigeração no armazenamento e transporte (temperaturas inferiores a 7 °C), bem como um prazo de validade limitado a alguns dias.

A resistência térmica dos micróbios que crescem no frio e em alimentos de baixa acidez foi investigada. Relativamente aos esporulantes, pasteurizações de 1 a 2 minutos a 95 °C causam uma redução decimal (1D) em estirpes psicotróficas do *Bacillus cereus*. O valor D relativo a esporos de *Clostridium botulinum* psicotróficos pode variar desde segundos a 85 °C até segundos a mais de 95 °C, dependendo das características do alimento e da estirpe do *C. botulinum*. Espécies patogénicas mais susceptíveis ao calor, nomeadamente *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*, requerem tratamentos térmicos da ordem de segundos a 60-70 °C para uma redução decimal. Relativamente a *Aeromonas hydrophila*, leveduras e bactérias lácticas, um processo térmico de poucos segundos a 55 °C é suficiente para uma redução decimal.

Em conclusão, recomenda-se o *Clostridium botulinum* psicotrófico como microorganismo de referência para o delimitação de processos de pasteurização em alimentos de baixa acidez e distribuídos em condições refrigeradas.

[Design of pasteurization processes for low-acid chilled foods]

The increasing consumption of minimally processed chilled foods has raised the number of food-borne infections and public safety concerns. Reduction in the numbers of unwanted pathogenic and spoilage microorganisms, and shelf-life extension, can be assured with a thermal pasteurization process, by heating the food to temperatures normally within 65-95 °C. Regarding low-acid foods, the microbial spores surviving the pasteurization have to be controlled, by using cold storage and transportation, and a limited shelf-life.

Heat resistance of the microbes able to grow in low-acid refrigerated foods was reviewed. Regarding spore-formers, pasteurizations of up to two minutes at 95 °C achieved one decimal reduction (1D) in psychrotrophic *Bacillus cereus*. The D-value for psychrotrophic *Clostridium botulinum* spores can vary from seconds at 85 °C to seconds at >95 °C, depending on the food characteristics and microbial strain. More heat susceptible vegetative pathogens such *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* required seconds at 60-70 °C for one 1D inactivation, whereas a few seconds at 55 °C were necessary for *Aeromonas hydrophila*, spoilage yeasts and lactic acid bacteria.

In conclusion, the use of psychrotrophic *Clostridium botulinum* as the reference microorganism for the design of low-acid refrigerated foods pasteurizations was suggested.

Segurança alimentar e importância epidemiológica dos procedimentos de limpeza e desinfecção a nível doméstico

Basto, T.¹, Brandão, C.², Marcelino, S.¹

1 ETGI polo Sintra

2 Laboratório de Microbiologia Alimentar, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

Objectivos: Realização de um inquérito para avaliar o grau de cumprimento de boas práticas de higiene e fabrico a nível doméstico e proceder à detecção e contagem de agentes bacterianos indicadores de contaminação fecal e/ou más práticas de higiene e desinfecção em frigoríficos, esponjas de lavar loiça e aos balcões de cozinha

Metodologias: Elaboração e aplicação de um inquérito com 30 questões (fechadas), sobre boas práticas de higiene a nível doméstico nomeadamente, estiva e limpeza/desinfecção do frigorífico, limpeza/desinfecção da bancada de trabalho, produtos de limpeza utilizados e periodicidade da limpeza/desinfecção. Recolha de amostras em 30 cozinhas, em superfícies (100 cm²) de três zonas distintas do frigorífico (carne, vegetais e charcutaria), a balcões e esponjas de lavagem da loiça. A partir das amostras foi efectuada a detecção, pesquisa e contagem de *Enterobacteriaceae* e de *Escherichia coli*.

Resultados: No que respeita ao inquérito realçam-se os seguintes aspectos: 62% usa um pano para limpar a zona de trabalho e 49% limpa o mesmo com detergente manual sem desinfectante, 48% muda a esponja uma vez por mês, 90% lavam a loiça com detergente manual sem desinfectante, 63% lava habitualmente o frigorífico, 33% desinfecta o mesmo e 42% fazem-no mensalmente.

Das 90 análises realizadas às três zonas dos frigoríficos foi detectada *Escherichia coli* em 3% e sempre na zona da carne e *Enterobacteriaceae* em 20% das amostras. Nas análises às 30 esponjas da loiça foram detectadas em 93% *Enterobacteriaceae* e em 47% *Escherichia coli*. Nas análises aos balcões de cozinha (100 cm²) foram detectadas em 63% *Enterobacteriaceae* e em 10% *Escherichia coli*.

[Food safety and epidemiological relevance of procedures in cleaning and disinfection at household level]

Objectives: Conduct a survey to assess the degree of compliance with good hygiene practices and manufacturing at home and detect and quantify bacterial agents indicators of fecal contamination in refrigerators, cleaning sponges and kitchen balconies.

Methods: Elaboration and implementation of a survey with 30 questions (closed), on good hygienic practices at the domestic level, regarding cleaning/disinfection of the refrigerator, cleaning/disinfecting the working surfaces, cleaners used and frequency of cleaning/disinfection. Sampling in 30 kitchens, considering surfaces (100cm²) of three distinct areas of the refrigerator (meat, vegetables and meats), the counters and sponges to wash the dishes. From the samples we detect, search and count of *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli*.

Results: Regarding the survey we highlight the following aspects: 62% use a cloth to clean the working area and 49% clean it with detergent without disinfectant, 48% change the sponge once a month, 90% wash the dishes with detergent without disinfectant, 63% usually wash the refrigerator, 33% disinfect it and 42% do so in the month.

Of the 90 tests carried out in to the three refrigerator zones, *Escherichia coli* was detected in 3% and always in the meat area. *Enterobacteriaceae* was found in 20% of the samples. In the analysis of the 30 cleaning sponges we found *Enterobacteriaceae* in 93% and *Escherichia coli* in 47%. In the analysis of kitchen surfaces (100 cm²) we detected *Enterobacteriaceae* in 63% and *Escherichia coli* in 10%.

Qualidade higiénica do leite de ovelha e relação com o estado sanitário da glândula mamária

Potes, M.E., Queiroga, M.C.

Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Depto. de Med. Veterinária, Universidade de Évora, Polo da Mitra, Valverde, Évora

A preferência cada vez mais acentuada, por parte dos consumidores, por produtos típicos e genuínos originários de regiões geográficas específicas, determina a procura crescente de leite de ovelha, principal matéria-prima usada no fabrico de queijos tradicionais em Portugal.

Segundo o Reg. 853/CE de 2004, o leite de ovelha destinado a produtos fabricados com leite cru por processos que não incluam qualquer tratamento térmico, deve ter um valor de mesófilos viáveis inferior a 500 000 por mililitro. Relativamente à contagem de células somáticas, para este leite não foi estabelecido nenhum critério ao contrário do estipulado para o leite produzido por fêmeas bovinas.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a qualidade higiénica e sanitária do leite de ovelha obtido por alguns produtores e destinado ao fabrico de queijo de Évora e investigar a eventual existência de uma relação entre os dois parâmetros citados anteriormente.

Foram analisadas 269 amostras de leite de conjunto, recolhidas semanalmente, provenientes de 8 explorações equipadas com ordenha mecânica, durante o período de um ano. A todas as amostras foi feito o Teste Californiano de Mastites (TCM) e a pesquisa de resíduos de antibióticos e os parâmetros analisados foram mesófilos viáveis (MV), células somáticas (CS) e pH.

Para o TCM, a moda foi 2, numa escala de 1 a 3, e todas amostras apresentaram resultado negativo à pesquisa de inibidores microbianos. A média geométrica de CS foi de 1 459 173 células somáticas por mililitro e a de MV foi de 181 574 ufc/mL. O pH médio foi de $6,81 \pm 0,08$.

Os elevados valores de CS obtidos traduzem a existência de uma grande prevalência de infecção intra-mamária que reduz fortemente a produção de leite e altera a sua qualidade. Por outro lado, a maior parte das explorações apresentaram valores de MV que cumpriam os critérios em vigor, relativamente ao leite destinado ao fabrico dos produtos com leite cru e sem qualquer tratamento térmico. Não se observou a existência de qualquer relação entre os valores de MV e de CS.

Podemos concluir que apesar de existir uma elevada prevalência de infecção intramamária nos rebanhos em estudo, as regras de higiene relativamente à obtenção de leite estarão, provavelmente, a ser respeitadas.

Contudo, uma vez que a maior parte dos microrganismos causadores de infecção intramamária é veiculada pelo leite, podendo entrar na cadeia alimentar e constituir um eventual perigo para a saúde pública, parece importante referir que a contagem de CS não deve ser negligenciada, como critério de qualidade do leite de ovelha.

[Milk quality and health status of ewes' mammary gland]

Traditional gastronomic products are increasingly getting the preference of consumers, thus ewes' milk, as the substrate for most traditional Portuguese cheeses, is in greater demand.

According to Reg.(EC)853/2004, raw milk from species other than cows intended for the manufacture of products made with raw milk by a process that does not involve any heat treatment must meet the criterion of plate count at 30 °C (per mL) < 500 000. Concerning somatic cell counting (SCC), a maximum value for sheep bulk tank milk has not been established, in opposition to cows' milk.

This work aims at accessing ewes' milk quality produced for the manufacture of "Queijo de Évora" and exploring a putative relation between plate count at 30 °C (per mL) and SCC.

Two hundred and sixty nine samples of bulk tank milk, weekly collected from 8 flocks, were analyzed over a period of one year. These samples were accessed for the presence of antibiotic residues, for plate count at 30°C and for somatic cell counting with both fluoro-opto-electronic method and California Mastitis Test (CMT) and pH.

All the samples were negative for antibiotic residues. Plate count geometric mean was 181 574 colony forming units per mL. CCS geometric mean was 1 459 173 somatic cells per mL and modal value for CMT was 2, in a 1 to 3 scale. Mean pH was $6,81 \pm 0,08$.

High SCC scores indicate a high prevalence of intramammary infection, which strongly affects milk yield and quality. Most flocks had plate count at 30 °C according to established criteria for milk intended for the manufacture of products made with raw milk, without any heat treatment. No relation between plate count at 30 °C and SCC was detected.

These results indicate that, in spite of the high intramammary infection prevalence detected in these flocks, probably the hygienic rules during milking procedures were properly followed.

However, as microorganisms causing intramammary infection are carried by milk, reaching the food chain and eventually threatening public health, it is important to consider that SCC may not be neglected as ewes' milk quality criterion.

Influência do sistema de produção e raça na qualidade nutricional da carne de cabrito

Quaresma, M.A.G., Pereira Silva, R., Trigo Rodrigues, I.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A desertificação do interior, o abandono das práticas agrícolas tradicionais e a intensificação dos sistemas de produção pecuários tem conduzido a uma forte diminuição do efectivo de raças autóctones de pequenos ruminantes e a sua substituição por raças exóticas. Tal situação resulta na perda da biodiversidade genética. A substituição dos sistemas de produção tradicionais, sustentados no pastoreio, por sistemas de produção intensivos onde o maneio alimentar é predominantemente baseado em alimentos concentrados, condiciona uma importante alteração na composição da fracção lipídica da carne com importantes repercussões na saúde humana.

Tendo por base toda esta problemática, foi objectivo deste estudo comparar o valor nutricional da carne de cabrito de raça Bravia (CB), produzido num sistema de produção extensivo e comercializado como Cabrito das Terras Altas do Minho_IGP, com a carne de cabrito de raça Saanen (CS), produzidos em explorações de leite num sistema de produção intensivo.

Utilizou-se para este estudo, o lombo (músculo *longissimus lumborum*) de 15 cabritos de cada uma das raças em análise. Os animais usados no estudo apresentavam pesos de carcaça de $5,6 \pm 0,8$ kg no CB e $5 \pm 0,5$ kg no CS. Foram realizadas as técnicas analíticas para a determinação dos lípidos totais, colesterol total e perfil de ácidos gordos.

A comparação realizada permitiu verificar que o CB apresenta uma carne significativamente ($P < 0,05$) mais magra que a carne do CS (9,8 e 12,0 mg/g de carne, respectivamente), embora se possam incluir ambas dentro da classe de carnes magras (teor de lípidos totais inferior a 5%). Numa análise global dos ácidos gordos da carne de cabrito com o recurso aos rácios nutricionais (PUFA/SFA e n-6/n-3) verificou-se que a carne de CB era mais saudável para consumo humano do que a de CS. Esta constatação deveu-se ao facto da carne CB apresentar ambos os rácios em concordância com as recomendações nutricionais estabelecidas a nível internacional, e que resulta de um teor total de ácidos gordos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) significativamente mais baixos e de um teor total de ácidos gordos poliinsaturados (PUFA) significativamente mais alto que o da carne SB. Em contraponto com o previamente descrito, a carne de CB apresenta um teor total de colesterol e um teor total ácidos gordos transesterificados (TFA) significativamente mais altos que os observados na carne de CS.

Podemos assim concluir que o sistema de pastoreio a que é submetida a raça Bravia condiciona um perfil de ácidos na carne que é favorável à saúde humana, embora a genética da raça pareça ser responsável por teores de colesterol mais elevados.

[Influence of breed and production system on kid goat meat nutritional quality]

The desertification of the inner countryside, abandonment of traditional agriculture practices and the intensification of husbandry practices have led to the decrease of small ruminant native flocks and their replacement by exotic breeds. This situation led to the loss of genetic biodiversity, while the replacement of traditional rearing methods, based on pasture grazing, by intensive rearing methods, based on concentrate feeding, conditions an important change in meat lipid fraction composition, which has important consequences to human health. Bearing in mind all these issues, it was this study objective to compare the nutritional value of Bravia goat kid meat (BK), a native breed produced under traditional rearing methods and Saanen goat kid meat (SK), which is produced in intensive dairy farms on the dependence of concentrate feeding.

For this study, we used the loin muscle (*longissimus lumborum* muscle) of 15 goat kids of each breed in comparison. The animals used in this study had a carcass weight of $5,6 \pm 0,8$ kg for BK and $5 \pm 0,5$ kg for SK. For the characterization of goat kid meat lipid fraction we performed the analytical procedures to quantify total lipids, total cholesterol and fatty acid profile. Both goat kid meats were considered lean (total fat below 5%), but the BK meat had significant lower contents of total fat than SK (9,8 and 12,0 mg/g of meat, respectively). A global analysis of goat kid meat, by the use of nutritional ratios (PUFA/SFA and n-6/n-3), shows that BK is considered a healthier choice than BS. Such suggestion is base on the fact that BK meat has both nutritional ratios in agreement with international nutritional recommendations, which results from a lower total content of saturated (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) and a higher total content of polyunsaturated fatty acids. Nevertheless, BK meat has also higher total cholesterol contents and total content of transesterified fatty acids (TFA) than SK meat.

Therefore, it is possible to conclude that Bravia breed feeding management, based on grazing leads to a healthier fatty acid profile to human nutrition, although Bravia genetics seems to be responsible for higher content of total cholesterol.

Rastreabilidade, segurança alimentar e confiança: o caso específico da raça Barrosã

Mendes, M.C.¹, Ribeiro, V.¹, Brito, N.V.²

1 AMIBA - Associação de Criadores de Bovinos da Raça Barrosã

2 Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Refóios do Lima

A segurança alimentar pressupõe pró-actividade – pensar e actuar para prevenir e preparar-se na resolução de problemas, riscos e perigos para a saúde pública. Muitos dos organismos que causam doenças ao Homem são parte integrante da flora gastrointestinal normal dos animais dos quais nos alimentamos, convivendo com eles sem causar quaisquer danos à sua saúde. As raças autóctones, nomeadamente a Barrosã, apesar da existência de programas e técnicas de melhoramento e conservação das raças, apenas poderão sobreviver com políticas socioeconómicas que privilegiem aspectos sociais e de sustentabilidade produtiva, tendo em vista a preservação de um património genético, do equilíbrio e desenvolvimento rural e certificação do produto. A rastreabilidade, sistema relevante para o conhecimento da origem e rasto de um género alimentício ao longo de todas as fases da produção, transformação e distribuição, garante valorizar e promover o produtor, para além de reforçar parâmetros de Segurança Alimentar, como a qualidade do produto, a sua credibilidade e, de forma não displicente, a confiança no consumidor. Procedeu-se a um acompanhamento exaustivo de diferentes animais de raça Barrosã, de diferentes idades e proveniências, durante três semanas, no circuito produtor ao consumidor.

Constatou-se que um ponto relevante a considerar é o processo de abate, desempenhando o matadouro um papel preponderante na garantia de qualidade do produto final, particularmente do tipo higiosanitário. É neste local que se observa uma maior probabilidade da ocorrência de potenciais perigos (físicos, químicos e microbiológicos) e consequentes riscos para a Saúde Pública, sendo minimizado com a aplicação de elevadas medidas de controlo através da implementação do sistema HACCP. A etapa mais exposta a estes perigos é a da desmancha, a qual sofre um rigoroso controlo por parte dos diferentes intervenientes, nomeadamente os responsáveis pela gestão do sistema e dos chefes de cada sala.

Os perigos mais significativos verificados nesta etapa foram:

- . Químicos: resíduos de detergentes/desinfectantes e óleos de lubrificação dos equipamentos;
- . Microbiológicos: contaminação e crescimento microbiano (*Staphylococcus* spp., aeróbios mesófilos, coliformes), contaminação microbiológica interna e contaminação cruzada, desenvolvimento de bactérias patogénicas (*Listeria monocytogenes*); desenvolvimento de microflora na superfície das embalagens;
- . Físicos: Corpos estranhos provenientes do operador (cabelos, botões); Corpos metálicos (presença de limalhas provenientes do uso de utensílios) (de muito baixa probabilidade e severidade).

O sistema HACCP implementado na unidade responsável pelo abate de animais de raça Barrosã está em constante monitorização por parte da equipa responsável dependendo da observação ou medição dos parâmetros de controlo a definição dos pontos críticos de controlo, garantia da qualidade e segurança do produto final – carne DOP “Raça Barrosã”.

[Traceability, food safety and confidence: Barrosã breed]

Food safety requires pro-activity - think and act to prevent and prepare to solve problems, risks and dangers to public health. Many of the organisms that cause Human diseases are an integrate part of the normal gastrointestinal flora of animals of which we consume, living with them without causing any damage to their health. The autochthonous breeds, including the Barrosã, despite the existence of programs and techniques for breeding and conservation of populations, can only survive with economic policies that favor the sustainability production, social concerns, preserving the genetic and local resources, product certification and, in the limit, rural development. The traceability system, relevant to the knowledge of the origin and food trail throughout all stages of production, processing and distribution, enhance and encourage producer guarantee, apart from strengthening food safety parameters such as product quality, credibility and, not displeasing, the confidence in consumers. The objective of this study, was the “follow up” of different Barrosã breed animals, of different ages and origins, during the three weeks time in the circuit producer to the consumer, in order to validate traceability and safety.

One of the most relevant process to consider is the slaughtering, playing the slaughterhouse a leading role in ensuring the quality of the final product, particularly in hygienic and sanitary issues. It is in this place where a higher probability of occurrence of potential hazards (physical, chemical and microbiological) may appear and consequently the emergence of public health risks, minimized with the application of high control measures through the HACCP implementation.

The most exposed step for those dangers is the cutting, which undergoes a rigorous inspection by different actors, including those responsible for system managing and sectors. The most significant dangers verified in this stage were:

- . Chemicals: residues of detergent / disinfectants and oil lubrication of equipment;
- . Microbiological: microbial and contamination growth (*Staphylococcus* spp., Total plate count, coliform), internal contamination and cross-contamination, pathogenic bacteria development (*Listeria monocytogenes*), microflora development on the packaging surface;
- . Physics: strange bodies from the operator (hair, buttons); metal corps (presence of metal powders from the utensils use) (a very low probability and severity).

The HACCP system implemented in this unit, responsible for Barrosã breed animals’ slaughter, is under constant monitoring, by their responsible team, depending the observation or parameters measurement of the evaluation of critical control points, required as a tool to assess and ensure the final product quality – Barrosã DOP meat.

Efeito do sistema de produção no perfil de ácidos gordos e isómeros conjugados do ácido linoleico da carne de bovino

Alfaia, C.P.M.¹, Alves, S.P.², Martins, S.I.V.¹, Fontes, C.M.G.A.¹, Lemos, J.P.C.¹, Bessa, R.J.B.², Prates, J.A.M.¹

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisboa, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
2 REQUIMTE, Unidade de Produção Animal, INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

Neste ensaio foram utilizados trinta e dois bovinos de raça Alentejana para avaliar o efeito de quatro sistemas de produção (apenas pastagem, pastagem seguida de 2 ou 4 meses de acabamento a concentrado, e apenas concentrado) sobre o perfil de ácidos gordos (GC-FID), incluindo a distribuição isomérica do ácido linoleico conjugado (CLA; Ag+-HPLC-DAD), da carne. Para além disso, os perfis de ácidos gordos e isómeros do CLA da carne foram utilizados para elucidar o impacto dos diferentes regimes alimentares no valor nutricional da gordura intramuscular, bem como a sua utilidade como discriminantes químicos da origem da carne. Os resultados indicam que o sistema de produção tem um efeito marcado no perfil de ácidos gordos, incluindo no perfil de isómeros do CLA, da carne Alentejana, o qual é independente do grau de deposição de gordura intramuscular. O ácido alfa-linolénico, os n-3 PUFA de cadeia longa e os isómeros do CLA t11,t13, t11,c13 e t12,t14 da carne são os indicadores mais sensíveis de ingestão de pastagem pelos animais. Os dados obtidos reforçam resultados anteriores que sugeriam que a carne de animais de pastoreio apresenta maior qualidade nutricional (devido principalmente a teores mais elevados de n-3 PUFA e CLA) do que a carne de animais alimentados a concentrado, o que se deve aos efeitos benéficos da pastagem no perfil de ácidos gordos da carne. A carne dos animais alimentados apenas com pastagem e com 2 meses de acabamento a concentrado apresentou razões PUFA/SFA e n-6/n-3 na gordura intramuscular dentro dos valores recomendados para a dieta humana, contrariamente à carne dos animais expostos a períodos de acabamento a concentrado mais longo (com excepção da razão PUFA/SFA na dieta de concentrado). Por último, o perfil de ácidos gordos da carne parece ser um marcador químico eficaz na discriminação dos quatro sistemas de produção analisados, incluindo os diferentes períodos de acabamento a concentrado, o que sugere que esta abordagem pode ser útil para o desenvolvimento duma ferramenta prática para a indústria nacional de carnes DOP.

Agradece-se o financiamento atribuído (projectos POCTI/CVT/2002/44750, AGRO/2003/512 e PTDC/2006/66114) e as Bolsas de Doutoramento concedidas a Susana P. Alves (SFRH/BD/2007/37793) e Susana I. V. Martins (SFRH/BD/2005/22566).

[Effect of the feeding system on fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle]

Thirty two Alentejano purebred bulls were used to investigate the effect of four feeding systems (pasture only, pasture feeding followed by 2 or 4 months of finishing on concentrate, and concentrate only) on meat fatty acid composition (GC-FID), including conjugated linoleic acid (CLA) isomeric distribution (Ag+-HPLC-DAD). In addition, meat fatty acids and CLA isomers were used to elucidate the impact of the different feeding regimens on the nutritional value of intramuscular fat and their usefulness as chemical discriminators of meat origin. Data reported here indicate that feeding systems have a major impact on the fatty acid profile, including CLA isomers, of Alentejano beef, which is independent of the degree of intramuscular fat deposition. Alpha-Linolenic acid, long chain n-3 PUFA, and t11,t13, t11,c13 and t12,t14 CLA isomers in meat were the most sensitive grass intake indicators. In addition, the data reinforce the evidence that beef from pasture-fed animals depicts higher nutritional quality (mainly due to the higher levels of n-3 PUFA and CLA) when compared to that from concentrate-fed bulls, as a result of the beneficial effects of grass on meat fatty acid profile. Meat from bulls fed with pasture only and from animals with a 2 month of finishing on concentrate showed PUFA/SFA and n-6/n-3 ratios of intramuscular fat inside the recommended values for the human diet, in contrast to that from animals exposed to longer finishing periods on concentrate (except for PUFA/SFA ratio in concentrate only diet). Finally, meat fatty acid profile seems to be an efficient chemical marker to discriminate the four feeding systems analysed, including the different finishing periods of animals on concentrate, suggesting that this approach might be useful for the development of a practical discrimination tool for Portuguese PDO beef industry.

Financial support (grants POCTI/CVT/2002/44750, AGRO/2003/512 and PTDC/2006/66114) and individual grants to Susana P. Alves (SFRH/BD/2007/37793) and Susana I. V. Martins (SFRH/BD/2005/22566) are acknowledged.

Prevalência e factores de risco para úlceras gástricas em suínos

Pinto, S., Lunet, N.

Departamento de Higiene e Epidemiologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto (ISPUP)

Introdução: A ulceração gástrica é uma patologia frequentemente observada nos estômagos dos suínos e pode ser uma importante causa de morte em algumas explorações. Os prejuízos económicos e bem-estar animal justificam o estudo da frequência e gravidade das lesões gástricas em suiniculturas, assim como os seus determinantes. A prevalência da úlcera gástrica em suínos é desconhecida em Portugal e, à excepção de factores nutricionais, os outros determinantes da doença são pouco claros. O objectivo deste estudo é quantificar a prevalência de úlceras gástricas na espécie suína e determinar a associação entre características dos animais e das explorações e a ocorrência de tais lesões.

Métodos: Foram incluídos neste estudo suínos de engorda híbridos (n=760), com aproximadamente 6 meses de idade, e suínos reprodutores (n=127), com idade igual ou superior a um ano. Os suínos foram seleccionados aleatoriamente num matadouro no Norte de Portugal, entre os animais provenientes de 9 explorações previamente especificadas. Os estômagos dos suínos foram avaliados visualmente com o objectivo de identificar úlceras. As informações sobre sexo, peso de carcaça, percentagem de carne magra e as características de manejo nas explorações foram obtidas por consulta dos registos do matadouro ou por inquérito aos médicos veterinários de cada exploração. A prevalência de úlceras gástricas foi calculada para toda a amostra, de acordo com a idade e sexo, e separadamente para os animais de cada exploração. As variáveis quantitativas são apresentadas como mediana e percentis 25 e 75, e foram divididas em quartis para comparações entre grupos.

A associação entre as características das explorações (dimensão das suiniculturas, mistura de lotes de animais, sistema de alimentação, existência de aquecimento/arrefecimento dos pavilhões, desinfecção sanitária sistemática, fonte de água) e da ocorrência de úlceras na região *pars oesophagea* foi quantificada através de Odds Ratio e respectivos intervalos de confiança a 95% (IC a 95%), calculados por regressão logística não condicional com erros padrão robustos (considerando cada exploração como um conglomerado). Os dados foram analisados usando o STATA®, versão 9.2.

Resultados: A prevalência total de úlceras na *pars oesophagea* foi de 18,7%, significativamente maior nos animais reprodutores (34,6% vs. 16,0%, p < 0,001), e observou-se uma grande variação das prevalências entre explorações (entre 7,5% e 41,2% para suínos de engorda e entre 8,3% e 71,4% para os animais reprodutores). A prevalência de úlceras na região glandular foi de 0,7%.

Os animais de engorda provenientes de explorações em que o abatecimento de água é efectuado através de mina ou poço apresentaram uma maior prevalência de úlceras na *pars oesophagea* do que os suínos de engorda provenientes de explorações com abastecimento de água através de furo de captação própria (OR = 3,49; IC 95% 1,75-6,94).

Não se observou associação significativa entre sexo, peso de carcaça / percentagem de carne magra, condições de manejo das explorações (e.g. mistura de lotes de suínos após o desmame ou antes da fase de engorda, sistema de alimentação, existência do sistema de aquecimento/arrefecimento, desinfecção sanitária sistemática) e a prevalência de úlceras na região *pars oesophagea* em suínos de engorda.

Conclusão: Concluímos que a prevalência da úlcera gástrica é alta nos suínos nacionais. Os nossos resultados sugerem que a fonte de água pode ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de úlceras na *pars oesophagea* em suínos.

[Prevalence and risk factors for gastric ulcers in swine]

Introduction: Gastric ulceration is the commonest pathology observed in the pigs' stomachs and can be an important cause of death in certain herds. Economics and welfare concerns justify the monitoring of swine populations to determine the prevalence and severity of gastric lesions. The prevalence of gastric ulcer in swine is unknown in Portugal and, apart from nutritional factors, its determinants are poorly understood. Therefore, we aimed to quantify the prevalence of gastric ulcers in swine and the association between animal and farm characteristics and the occurrence of these lesions.

Methods: Finishing pigs (n=760), approximately 6 months old, and culled breeding animals (n=127), aged one year or more, were randomly selected at a slaughterhouse in the North of Portugal, among the animals from 9 previously specified farms. Their stomachs were visually evaluated for the presence of ulcers. Information on gender, carcass weight, lean meat percentage, and farm/managing characteristics were obtained. The prevalence of gastric ulcers was computed for the whole sample, according to age and gender, and separately for animals from each farm. Quantitative variables are presented as median, and 25 and 75 percentiles, and were partitioned into quartiles for comparisons across groups.

The association between farm characteristics (dimension of the farm, mixing pigs, feeding system, air ventilation, heating system, systematic sanitary disinfection, source of water) and the occurrence of *pars oesophagea* ulcers was quantified through crude Odds Ratios and 95% Confidence Intervals (95% CI), computed by unconditional logistic regression with robust standard errors (allowing for clustering by farm). Data were analyzed using STATA®, version 9.2.

Results: The overall prevalence of ulcers in *pars oesophagea* was 18.7%, significantly higher in breeding animals than in finishing pigs (34.6% vs. 16.0%, p < 0.001), and a wide variation was observed across farms (range: 7.5%-41.2% for finishing pigs, 8.3%-71.4% for breeding animals). The overall prevalence of ulcers in the glandular region was 0.7%.

Finishing pigs from farms with mine/well water supply had a higher prevalence of *pars oesophagea* ulcers than those from farms with pit water supply (OR=3.49; 95% CI 1.75-6.94).

There was no significant association between gender, carcass weight/back-fat, or managing conditions of the farms (e.g. mixing pigs after weaning or before finishing phase, feeding system, type of air ventilation, presence or not of heating system, systematic sanitary disinfection) and the prevalence of *pars oesophagea* ulcers in finishing pigs.

Conclusion: The prevalence of gastric ulcer in this survey is in the upper range of the observation in other countries. Our results suggest that the source of water may be important risk factor to the development of ulcers in *pars oesophagea*.

Evaluación de las medidas de bioseguridad en explotaciones porcinas

Simon, M., Casal, J.

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Edificio V, 08193 Bellaterra, Barcelona

El objetivo del presente trabajo fue determinar las principales medidas de bioseguridad en 81 explotaciones porcinas de España durante el pasado año 2007. Así mismo, con el fin de determinar la evolución de la aplicación de las medidas de bioseguridad en las explotaciones porcinas de España, los resultados obtenidos se compararon con los previamente reportados por Casal *et al.* (2007) durante el periodo 2000-2001,

La encuesta incluía cuestiones referentes a datos generales de la granja y medidas de bioseguridad relacionadas con la localización, la reposición, el manejo y las instalaciones. Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa SPSS v14.

El nivel de bioseguridad en las granjas estudiadas fue medio. Las medidas de bioseguridad dirigidas a evitar la entrada de enfermedades a través de la introducción de nuevos animales eran las presentes con mayor frecuencia, y las relacionadas con las visitas y vehículos las que se aplicaban con menor frecuencia.

En general, la aplicación de medidas de bioseguridad no ha aumentado en los últimos años tendiendo a disminuir o en el mejor de los casos a mantenerse. Las medidas de bioseguridad relacionadas con el control de vehículos se aplicaron con mayor frecuencia en las granjas del estudio previo. Sin embargo, debido a que las granjas incluidas en el estudio de Casal *et al.* (2007) no fueron seleccionadas aleatoriamente, los resultados obtenidos en la comparación de ambos estudios deben ser interpretados cuidadosamente.

[Evaluation of biosecurity measures in swine farms]

The purpose of this study was to determine the main biosecurity measures applied in 81 swine farms in Spain during 2007. Likewise, in order to determine the evolution of the application of biosecurity measures in swine farms in Spain, the results were compared with those previously reported by Casal *et al.* (2007) during the period 2000-2001,

The survey included questions concerning general data from the farm and biosecurity measures related to the location, restocking, management and facilities. The results were statistically analyzed with the SPSS software V14.

The level of biosecurity on farms studied was medium. The biosecurity measures aimed at preventing the entrance of diseases through the introduction of new animals were present more frequently, while those related to the visits and vehicles were applied less frequently.

In general, the application of biosecurity measures has not increased in recent years, in fact there is a tendency to their reduction, or at the very best stay at the same level. Biosecurity measures relating to the control of vehicles were used more frequently in the farms of the previous study. However, because the farms included in the study by Casal *et al.* (2007) were not randomly selected, the results of the comparison of both studies should be interpreted carefully.

Análise de sobrevivência aplicada à identificação de factores de risco. Caso prático: factores associados à persistência de *Salmonella* em explorações de suínos na Dinamarca

Baptista, F.M.^{1,2}, Alban, L.³, Ersbøll, A.¹, Nielsen, L.R.¹

1 Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

3 Danish Meat Association

A análise de sobrevivência é uma metodologia estatística originalmente utilizada para avaliar o tempo de sobrevivência de indivíduos desde um tempo inicial (ex. cirurgia) até à ocorrência de um determinado evento de interesse (ex. morte). Genericamente, permite modelar o tempo para a ocorrência de um evento, tendo em consideração a existência de informação “censurada”, i.e., quando o evento não ocorre durante o período em análise ou quando essa informação é desconhecida (ex. indivíduo vivo no final do período em análise). Através destes modelos pode também ser avaliado o efeito de diversos factores no tempo de ocorrência de um evento.

Neste estudo apresentamos uma aplicação da análise de sobrevivência à identificação de factores de risco para a persistência de títulos sorológicos elevados para *Salmonella* em explorações de suínos na Dinamarca.

Desde 1995, a Dinamarca implementou um Programa Nacional de Vigilância e Controlo da *Salmonella* em suínos para abate. O programa baseia-se em testes sorológicos que permitem classificar as explorações em três níveis de prevalência. As explorações com um nível moderado/alto (índice de *Salmonella* ≥ 40) são sujeitas a medidas de controlo e colheita de amostras fecais para exame bacteriológico e serotipificação.

Dados recolhidos de Janeiro de 2005 a Novembro de 2007 foram utilizados para investigar o efeito do serótipo, do ano, da estação do ano e da dimensão do efectivo.

Um “evento” foi definido como um retorno a baixa sorologia (índice de *Salmonella* < 40) durante 6 meses consecutivos. Foram incluídos 1433 eventos numa análise preliminar utilizando o método Kaplan Meyer. Todas as variáveis analisadas revelaram-se significativas ($p < 0,05$).

Todas as explorações positivas ($n=1242$) para os dois serótipos mais frequentemente isolados na Dinamarca (*S. Typhimurium*, *S. Derby*) foram analisadas num modelo de regressão de Cox.

As explorações infectadas com *S. Typhimurium* estavam associadas a períodos mais longos de elevada sorologia (HR=0,69; $p < 0,001$), comparativamente com *S. Derby*.

As explorações com elevada prevalência no Verão e Outono apresentaram períodos de elevada sorologia mais curtos, comparativamente com o Inverno e a Primavera ($p < 0,001$).

Comparativamente com 2005, os períodos de elevada sorologia para *Salmonella* foram menos frequentes e mais curtos em 2006 e 2007 ($p < 0,001$). As explorações com efectivos maiores estavam associadas a períodos mais curtos de elevada sorologia ($p = 0,012$). Este facto sugere que a implementação de medidas de biossegurança é mais eficaz nas explorações com efectivos maiores.

[Survival analysis applied to the identification of risk factors. Practical approach: factors associated to the persistence of *Salmonella* in pig herds in Denmark]

Survival analysis is a statistical methodology originally used to evaluate the survival time of subjects from a starting time (eg. surgery) to the occurrence of a particular event of interest (eg. death). More generally, it allows modelling the time to event data, taking into account “censored” data, i.e., when the event does not occur during the study period or when the exact time is unknown (eg. the subject is alive by the end of the study period). These models can also be used to evaluate the effect of different factors in the time to event occurrence.

In this study we presented the use of survival analysis for the identification of risk factors associated with the persistence of high *Salmonella* serology levels in pig herds, in Denmark.

Since 1995, Denmark implemented a National Surveillance-and-Control Programme for *Salmonella* in finisher pigs. It is based on serological surveillance that enables assignment of pig herds into three prevalence levels. Herds in moderate/high levels are subjected to control measures and pen faecal sampling for bacteriological examination and serotyping.

Data from January 2005 to November 2007 were used to investigate the effect of serotype, year, season and herd size.

An “event” was defined as return to low serology measured by a *Salmonella* index < 40 , for at least 6 consecutive months. A total of 1,433 events were included in the preliminary analysis using the Kaplan-Meyer method. All explanatory variables were found to be significant ($p < 0,05$). Cox proportional hazards regression was used for herds infected with *S. Typhimurium* or *S. Derby* ($N=1,242$).

Herds infected with *S. Typhimurium* were associated to longer high serology periods compared to *S. Derby* (HR=0.69, $p < 0,001$). Herds with high seroprevalence in Summer and Fall presented shorter high serology periods, compared to Winter and Spring ($p < 0,001$). Compared to 2005, periods with high *Salmonella* serology were fewer and shorter in 2006 and 2007 ($p < 0,001$). A positive impact of herd size was found, with larger herds being associated with shorter high serology periods, compared to smaller herds ($p = 0,012$). This might reflect an improved efficacy of the implementation of biosecurity measures in large herds.

Indentificacion de factores de riesgo para enfermedades del cerdo utilizando informacion existente en la industria porcina Britanica

Sánchez Vázquez, M.¹, Smith, R.², Gunn, G.¹, Edwards, S.³

1 SAC; 2 Veterinary Laboratory Agency; 3 Newcastle University.

Recientemente la industria porcina británica ha liderado el desarrollo de iniciativas sanitarias y programas de calidad en las granjas. Las iniciativas sanitarias informan a sus miembros sobre presencia de lesiones detectadas en los mataderos, a menudo asociadas con problemas de bajo rendimiento en la producción. Los programas de garantía de calidad han sido desarrollados por la industria en respuesta a un aumento en la demanda de una garantía en los estándares de bienestar animal y seguridad alimentaria.

Ambos sistemas, recogen información complementaria sobre sanidad porcina y características de las granjas. Este proyecto financiado por Defra (equivalente al MARM español), combina las diferentes fuentes de datos para identificar aquellas características en la producción que puedan predisponer a los problemas de salud en el cerdo. Para este estudio reclutamos la información de las tres principales compañías responsables de los programas de calidad en las granjas (Assured British Pigs, Genesis QA and Quality Meat Scotland) que recogen generalmente información acerca del tamaño de la granja, el modo de alimentación y características de alojamiento. Adicionalmente utilizamos la información recogida en los mataderos a través de las dos iniciativas sanitarias que cubren el territorio británico (Wholesome Pigs Scotland and British Pig Health Scheme) centrándonos en tres lesiones principales: neumonía enzootica (NE), pleuritis e hígado de manchas blancas (HMB).

Mínuciosa minería de datos ha sido una parte importante del estudio, con el objeto de extraer la información relevante y a su vez común a todas las bases de datos utilizadas. Exploramos con un análisis de series temporales la distribución de las diferentes prevalencias en el tiempo. Usamos Modelos Lineales Generalizados Mixtos en análisis multivariados permitiendo error aleatorio a nivel de lote.

Los análisis de series temporales revelan una tendencia descendente en las prevalencias de NE y pleuritis; y tendencia estable para HMB. Para esta última lesión observamos un patrón regular en las fluctuaciones anuales sugiriendo la presencia de una pauta estacional. El análisis multivariable selecciona diferentes características de las granjas asociadas con las diferentes lesiones investigadas. Por ejemplo: La lesión de NE aparece positivamente asociada con el uso de un suelo con “slat” parcial mientras que el uso de cama aparece como un posible factor protector.

Este estudio muestra como los sistemas de vigilancia epidemiológica en los mataderos son un sistema rentable para ayudar a minimizar los problemas de salud y bienestar animal. Estos resultados en combinación con futuras actualizaciones pueden abrir las puertas para implantar estrategias selectivas en la monitorización de problemas sanitarios en las granjas basados en el riesgo.

[Combining existing management and health data from the UK pig industry to identify risk factors for pig diseases]

In the recent years the British Pig Industry has worked towards the development and widespread implementation of health schemes and farm quality assurance (QA) programmes. The cornerstone of the health scheme's success has been the frequent feedback of benchmarked results from routine abattoir inspections to the participating producers, to help increase their understanding of the occurrence of subclinical diseases. The presence of these endemic diseases is often related to impaired farm production performance and consequent increases in costs. Whereas, the farm QA programmes have been developed by the industry in response to an increasing demand for a welfare and food safety standard.

The information collected by the health schemes and farm QA programmes provide a complimentary dataset believed to be suitable for epidemiological analysis. Our Defra funded project combined this existing information to explore the outputs from the abattoir monitoring, in relation to the farm information, to help identify management practises that predispose pig herds to health problems.

The three main quality assurance companies present in Great Britain: Assured British Pigs, Genesis Quality Assurance and Quality Meat Scotland, were recruited into the study. The available information provided by all three schemes included pig stocking levels; feeding practices; and housing systems.. Data on the three main types of lesion scores; enzootic pneumonia-like lesions (EP-like), pleurisy and milk spot, was also collected from the two existing abattoir-based health schemes: Wholesome Pigs Scotland and the British Pig Health Scheme.

Data-mining was an important part of this study to extract the relevant epidemiological information common to these databases. Exploratory time series analysis was carried out to focus on understanding the temporal distribution of prevalences and Generalized Linear Mixed Models were used for multivariable analysis, allowing for random error at batch level.

The time series analysis revealed secular changes in the prevalence of EP-like lesions and pleurisy, with an overall reduction in the lesion score, while milk spots presented a stable trend of a regular annual pattern with potential seasonal variation. Multivariable analyses choose different farm characteristics as predictors for the different lesions studied, for example; EP-like lesion appeared to be positively associated with the use of partly slatted flooring, while the presence of bedding material was associated as a significant protective factor.

This study shows how abattoir surveillance provides cost-effective epidemiological data to help monitor pig health and welfare. The continuing updating and subsequent analysis of the data may open the door for the implementation of risk based strategies for abattoir monitoring.

El papel de factores geográficos en el programa de erradicación de la enfermedad de Aujeszky en Cataluña (2003-2007)

Allepuz, A.^{1,2}, Saez, M.^{3,4}, Solymosi, N.⁵, Napp, S.¹, Casal, J.^{1,2}

1 Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Edificio V, 08193 Bellaterra, Barcelona

2 Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

3 Research Group on Statistics, Applied Economics and Health (GRECS), University of Girona. Campus de Montilivi, 17071 Girona

4 CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP)

5 Adaptation to Climate Change Research Group, Hungarian Academy of Science, Budapest, Hungary

En este estudio analizamos el papel que podían desempeñar factores geográficos en la transmisión a nivel local del virus y en la persistencia de la enfermedad de Aujeszky en determinadas zonas. Para ello, usamos un modelo jerárquico bayesiano y en él incluimos diferentes variables geográficas que podían estar implicadas en la transmisión a nivel local del virus; como son la distancia al matadero más cercano, distancia a la carretera más próxima, número de animales de engorde positivos próximos a la granja (radio de 750 metros) y número de cerdas positivas próximas a la granja (radio de 750 metros). En el modelo también incluimos otra variable no geográfica: tipo de granja (ciclo abierto o ciclo cerrado). El uso de estos modelos jerárquicos bayesianos permite incorporar un término que tiene en cuenta la dependencia espacial (autocorrelación) existente en los datos. La dependencia espacial fue incluida en el modelo mediante una distribución normal condicionalmente autoregresiva (CAR) basada en un número de vecinos. Dichos vecinos fueron definidos como aquellas granjas localizadas en un radio de 500 metros de cada granja de cerdas.

De las cuatro variables geográficas incluidas en el modelo, sólo la presencia de animales de engorde positivos presentes en la proximidad de una granja de cerdas incrementaba la probabilidad de infección por el virus de Aujeszky. En el primer periodo, por cada 1000 cerdos de engorde en la vecindad de cada granja de madres, el odds (razón de probabilidades) de ser positiva de cada granja se incrementaba por un factor entre 1.005 y 1.36. En el periodo 2.2, tener cerdos de engorde en la vecindad aumentaba la razón de probabilidades de infección por un valor entre 1.84 y 3.22. En el periodo 2.1 y en el periodo 3, ninguna de las variables influyó de forma significativa en la probabilidad de ser una granja positiva. El tipo de granja (ciclo abierto o ciclo cerrado) tampoco se relacionó con la probabilidad de ser una granja positiva en ninguno de los periodos del estudio.

El patrón geográfico de los residuos (observados versus predichos) del modelo binomial jerárquico bayesiano fue muy similar al de los observados, en todos los periodos del estudio. Este resultado evidencia que la transmisión a nivel local del virus de Aujeszky probablemente no haya sido el principal factor relacionado con la persistencia del virus en granjas de cerdas. Otros factores, específicos de cada granja, probablemente tengan una relación más alta en la probabilidad de infección que las variables geográficas incluidas en este análisis.

[The role of geographical factors on the success of Aujeszky's disease eradication programme in a high pig density area (northeast of Spain, 2003-2007)]

In this study, we tested the role of geographical factors that could be implicated in local spread and persistence of AD in certain areas. Several geographic variables describing the possible risk factors associated to neighbourhood transmission: Distance to the nearest slaughterhouse, distance to conventional roads, mean number of AD serological positive sows and serological positive fattening pigs in the neighbourhood (750 meters radius) of each sow farm were included in a hierarchical Bayesian binomial model. A non geographic variable; type of farm (farrow to weaning versus farrow to finish) was also included. The use of Bayesian models allowed us to take into account the spatial dependence (autocorrelation) among the data; included in the model as a random effect. Spatial dependence was parameterised with a conditional autoregressive distribution (CAR) based on a set of neighbours. The set of neighbours was defined as those farms located in a 500 meters buffer radius around each sow farm.

From the four geographical variables included in the model, only positive fattening animals in the neighbourhood of sow farms increased the probability of being AD positive. In the first period, 1,000 positive fattening pigs in the neighbourhood (750 meters buffer radius) increase the odds of each sow farm being AD positive by a factor between 1.005 and 1.36. In period 2.2, having positive fattening animals in the neighbourhood increased the likelihood of each sow farm to be AD positive between 1.84 and 3.22. In period 2.1 and period 3, none of the variables had a positive relation with the probability of being positive. The type of farm (farrow to weaning or farrow to finish) also did not influence the probability of being AD positive in any period.

The geographical pattern of the residuals of the hierarchical bayesian binomial model (observed versus predicted) was very similar to the observed infection in sow farms in all the eradication periods, showing that neighbourhood transmission might not be the main factor related to the eradication of Aujeszky's disease in sow farms. Other herd-specific risk factors might be much more related to the probability of AD infection than the geographical variables included in this study.

Análise de risco em bem estar animal - Experiência de diversos grupos de trabalho da EFSA

Nunes, T.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A avaliação de risco é um dos componentes da análise de risco. O objectivo da avaliação de risco é identificar os perigos e calcular a probabilidade e a magnitude dos efeitos adversos resultantes da exposição a esses perigos. Nas últimas décadas a análise de risco tem sido bastante útil na área das ciências animais como ferramenta de apoio à decisão, na definição de legislação e em outras medidas baseadas em ciência. Esta ferramenta tem sido particularmente útil na área da Segurança Alimentar e na movimentação animal. Nestas duas áreas existem normas que definem quais os passos a tomar no desenvolvimento de avaliações de risco. Diversas instituições como a OIE ou a EFSA têm como obrigação emitir pareceres científicos em bem estar animal, de uma forma objectiva, transparente e independente. No entanto, as normas existentes não podem ser directamente aplicadas ao bem estar animal, sem serem revistas e adequadas às especificidades desta área. Nesta apresentação, são discutidos os principais desafios encontrados na aplicação de metodologias de avaliação de risco quantitativas, em diversos grupos de trabalho da EFSA.

[Risk Assessment of Animal Welfare - Sharing EFSA's working groups experience]

Risk assessment is part of the risk analysis framework. The objective of risk assessment is to identify the hazards, and to estimate the probability and magnitude of the adverse effects resulting from exposure to those hazards.

In the last decades risk assessment has been useful in the animal science area as a tool to help decision makers to establish standards and other guidelines based on science. The risk assessment should be scientifically based, well documented, objective, repeatable, transparent and open to review. These principles are fundamental to substantiate the results of a risk assessment. This tool has been particularly used in food safety and animal importation. For these two areas, there are standards that establish the steps to take when performing a risk assessment.

There are several institutions like OIE or EFSA that have to provide objective, transparent and independent scientific advice in animal welfare. But since most of the existing risk assessment standards were developed to address other specific issues, these standards should not be directly applied to animal welfare without being revised or adjusted to the specificities of this field.

In this presentation, we report the main challenges faced in the application of risk assessment methodologies in several EFSA working groups in animal welfare.

Agregación espacial de la Leishmaniosis canina en una zona endémica del Mediterráneo

Berriatua, E.¹, Giménez, Font, P.², Manchón, M.¹, Ruiz de Ybañez, R.¹, Segovia, M.³, Alonso, F.¹

¹ Departamentos de Sanidad Animal y Genética y Microbiología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia

² Instituto Universitario de Geografía, Universidad de Alicante, Apdo. 99, 03080 Sant Vicent del Raspeig, Alicante

Se estudio la seroprevalencia, distribución espacial y factores de riesgo medioambientales de la leishmaniosis canina en 807 perros sanos del Municipio de Crevillente, Alicante, en el Sureste de España. La zona, con una extensión de 103 km² está dividida en 66 partidas administrativas y tiene un censo humano de 27000 personas, de las cuales el 90% reside en el casco urbano de Crevillente. La seroprevalencia global en perros ≥ 1 año de edad fue 22% y varió entre 12% en perros urbanos y 0-100% en otras partidas. Las partidas con seroprevalencia alta se situaron en la zona mas alta y árida del municipio, dónde el tipo de suelo predominante es la costra de conglomerado, ocupado por terreno agrícola de secano y casas con jardín. Por el contrario, las zonas de seroprevalencia nula y baja se localizaron en la parte más baja, plana y húmeda del municipio, constituida por suelos de arcilla y limos y ocupada por zonas residenciales similares y mayores extensiones agrícolas, principalmente de regadío. Se investigó la relación entre el estado serológico y variables del perro y del medioambiente de su lugar de residencia, empleando la regresión logística aleatoria. Por la fuerte correlación entre algunas variables medioambientales, se empleó el Criterio Bayesiano de Schwarz para seleccionar el modelo logístico más parsimonioso. En dicho modelo el riesgo de ser seropositivo fue máximo en perros de 5-6 años de edad, aumentó con el peso del animal y se asoció negativamente al porcentaje de agua superficial y a la densidad humana y positivamente al porcentaje de costra de conglomerado de la partida de residencia del perro. El estudio confirma la existencia de focos hiperendémicos en zonas endémicas y su estrecha relación con las características demográficas y medioambientales del lugar. Específicamente, demuestra la fuerte asociación entre la leishmaniosis y un tipo de suelo que podría reunir las condiciones ecológicas ideales para el desarrollo del vector local de *L. infantum*, *Phlebotomus perniciosus*, incluida la presencia de reservorios de infección no caninos. Los resultados de este trabajo plantean la necesidad de realizar nuevos estudios epidemiológicos y entomológicos en otras zonas endémicas como paso preliminar para diseñar intervenciones de control de leishmaniosis racionales y eficientes.

[Spatial heterogeneity in canine *Leishmania infantum* seroprevalence in an endemic Mediterranean area]

L. infantum seroprevalence and dog- and environmental-level risk factors were investigated in 807 healthy dogs in the Municipality of Crevillente, Alicante, in southeast Spain. The area is 103 km² divided in 66 administrative zones and has a human census of 27000 people, 90% of which lived in the urban town of Crevillente. Seroprevalence in dogs ≥ 1 year old was 22% however; it was 12% in town dogs and 0-100% in remaining zones. High seroprevalence zones were in the highest and driest inhabited part of the municipality, where the predominant ground was conglomerate crust, occupied by non-irrigated farmland and houses with gardens. Null and low seroprevalence zones were in the flat and lowest part of the municipality, the predominant terrain was clay and silt and were occupied by similar residential areas and larger irrigated farmland extensions. The relationship between the dog's serological status and variables related to the dog and the environment where it lived was investigated using random effects logistic regression. Given the strong correlation between some of the environmental variables, Schwarz's Bayesian Criterion was employed to select the most parsimonious logistic model. In this model the risk of being seropositive was highest among 5-6 years-olds, increased with body weight and was associated to its zone of residence having low percentage of surface water and human density and increasing percentage of conglomerate crust. The study confirms the existence of hiperendemic foci within *L. infantum* endemic zones associated to demographic and environmental factors. It specifically demonstrates a strong association between Leishmaniosis and a terrain type that may provide the right ecological conditions for the local *L. infantum* vector, *Phlebotomus perniciosus*, including the presence of alternative non-canine reservoirs of infection. These results highlight the need to carry out similar epidemiological and entomological studies in other endemic regions as preliminary step for designing rational and efficient Leishmaniosis control strategies.

Estimar a distribuição espacial da probabilidade de doenças infecciosas em uma região usando modelos co-kriging

Martinez, M., Perez, A., Torre, A., Iglesias, I., Muñoz, M.J.
CISA-INIA; UC Davis

Uma das suas principais características das doenças infecciosas é que elas tendem naturalmente a ser distribuídas em padrões espaciais associadas a fatores que influenciam o risco de ocorrência de doença. Análise espacial visa a) identificar áreas de alto risco, ou geograficamente relacionadas com áreas de risco para uma determinada doença e b) avaliar a natureza e a extensão da doença na qual é influenciada pela presença / ausência de fatores epidemiológicos. Co-kriging autocorrelação entre os modelos doença incidência ou prevalência, bem como o cross-correlação com as variáveis que influenciam a hipótese distribuição da doença, para produzir estimativas suavizadas da doença em uma distribuição espacial quadro. Probabilidade de co-kriging é uma extensão da técnica que resulta em estimativas da probabilidade de identificação de casos apreciados em toda a região, mais do que o número de casos em bruto. Os potenciais benefícios da aplicação da probabilidade de co-kriging em epidemiologia veterinária é aqui ilustrada através de exemplos de febre aftosa (FA) no Paquistão e na prevalência gripe aviária altamente patogênica (GAAP H5N1) a incidência na Europa.

Em ambos os casos, a prevalência (FA) e incidência (GAAP H5N1) foram divulgados em localizações geográficas específicas, e a conhecida distribuição espacial da população em risco, foi utilizada como hipoteticamente o fator de risco para doença influência. Um semivariograma, que é a expressão matemática da autocorrelação entre pares de pontos amostrados, foi montado usando um modelo K-Bessel, que é uma função que realça a local geográfica influência das estimativas. No Paquistão, a abordagem foi utilizada para prever áreas de maior probabilidade de sofrer parenta febre aftosa. A distribuição espacial estimada do risco foi coerente com avaliações independentes realizadas no país e com transmissão transfronteiras em toda a Ásia Central e na Índia. Na Europa, a técnica foi aplicada para produzir alisadas distribuições de GAAP H5N1, que levou para a avaliação dos esforços de vigilância na UE através da comparação dos resultados com a intensidade de amostragem de pássaros silvestres por país. A relação entre a intensidade de amostragem e de risco para a doença era relativamente mais elevada em Espanha e os Países Baixos, o que poderia ser explicado por fatores sociais vigentes.

Em conclusão, a aplicação de probabilidade de co-kriging métodos aumentou a precisão das estimativas de risco para as doenças em regiões avaliadas as estimativas porque resultou da relação entre o número de casos notificados e da distribuição das variáveis relacionadas, e não a partir da distribuição da doença notificações sozinhas. A técnica é especialmente adequada para a elaboração de mapas de risco de concepção-espacialmente explícita controle, prevenção, erradicação e estratégias, bem como um contributo para as avaliações de risco e doença de modelização e de vigilância em medicina veterinária.

[Estimating the spatial distribution of the probability of infectious diseases in a region using co-kriging models]

A major feature of infectious diseases is that they naturally tend to be distributed in spatial patterns associated with factors that influence the risk for disease occurrence. Spatial analysis is aimed at a) identifying high risk areas, or geographically related risk areas for a given disease and b) assessing the nature and extent at which disease occurrence is influenced by the presence/absence of epidemiological factors. Co-kriging models the autocorrelation between disease incidence or prevalence, and the cross-correlation with the variables hypothesized to influence the distribution of the disease, to produce smoothed estimates of disease distribution in a spatial framework. Probability co-kriging is an extension of the technique that results in estimates of the probability of identifying cases throughout the assessed region, rather than the raw number of cases. The potential benefits of the application of probability co-kriging in veterinary epidemiology is illustrated here using examples of foot and mouth disease (FMD) prevalence in Pakistan and highly pathogenic avian influenza (HPAI H5N1) incidence in Europe.

In both cases, prevalence (FMD) and incidence (HPAI H5N1) was known at specific geographical locations, and the known spatial distribution of the population at risk was used as the factor hypothesized to influence disease risk. A semivariogram, which is the mathematical expression of the autocorrelation between pairs of sampled points, was fitted using a K-Bessel model, which is a function that stresses the local spatial influence of the estimates. In Pakistan, the approach was used to predict areas with the highest relative probability of suffering FMD outbreaks. The estimated spatial distribution of risk was consistent with independent assessments conducted in the country and with transboundary transmission throughout Central Asia and India. In Europe, the technique was applied to produce smoothed distributions of HPAI H5N1, which ultimately led to the evaluation of surveillance efforts in the EU by comparison of the results with the intensity of wild bird sampling per country. The relation between intensity of sampling and risk for the disease was relatively higher in Spain and The Netherlands, which could be explained by prevailing social factors.

In conclusion, application of probability co-kriging methods increased the accuracy of estimates for disease risk in the assessed regions because estimates resulted from the relation between number of cases reported and the distribution of related covariates, rather than from the distribution of disease notifications alone. The technique is particularly suitable for the elaboration of risk maps, design of spatially-explicit control, prevention, and eradication strategies, and as an input for risk assessments and disease modelling and surveillance in veterinary medicine.

Modelação da ocorrência e abundância espacial dos vectores da Língua Azul recorrendo a tecnologias de Detecção Remota e Sistemas de Informação Geográfica: comparação de metodologias

Martins, H., Nunes, T., Boinas, F.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A Língua Azul (LA), é uma doença infecciosa não contagiosa que afecta animais de espécies ruminantes. Embora não constitua uma ameaça para a saúde do homem, a LA é uma doença com elevado potencial de dispersão, capaz de causar graves prejuízos sócio-económicos. A LA é causada por um arbovírus (BTV) da família *Reoviridae* cuja transmissão está geralmente associada à acção de um insecto vector do género *Culicoides*. A espécie *Culicoides imicola* constitui o principal vector deste vírus na Bacia Mediterrânica. A implementação de programas de vigilância entomológica permite o registo contínuo de dados de vital importância para a investigação da dinâmica espacial e temporal dos vectores LA. Em Portugal este programa encontra-se implementado desde Maio de 2005 proporcionando já uma quantidade considerável de informação sobre a distribuição e abundância espacial das diferentes espécies de *Culicoides* existentes no país.

A Detecção Remota (DR) consiste no processo de aquisição de informação sobre um objecto geográfico através da utilização de sensores implementados em aeronaves ou satélites. Estes registam a interacção entre a matéria e a energia eléctrica, magnética, electromagnética e vibracional permitindo, dessa forma, inferir sobre as características físicas e químicas dos objectos à face da Terra permitindo a caracterização e monitorização de variáveis biofísicas, ambientais e climáticas que influenciam a sobrevivência, o desenvolvimento e a dispersão dos vectores da LA.

A modelação espacial é muito utilizada no processo de investigação epidemiológica e recorre a aproximações matemáticas (estocásticas ou determinísticas) para simular a distribuição e abundância espacial, temporal e espaço-temporal de um fenómeno através de uma estrutura lógica de regras e relações.

Recorrendo a Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e combinando dados entomológicos e dados das diferentes variáveis ambientais (derivadas da DR), é possível, através da modelação, prever a distribuição e propagação dos vectores da LA e, consequentemente, identificar as zonas de risco para a transmissão da doença. Estes modelos permitem, portanto, sustentar e apoiar o desenvolvimento de medidas de controlo sanitário mais apropriadas e eficientes na erradicação da doença.

Pretende-se, com este trabalho, comparar duas metodologias distintas (regressão logística e análise discriminante) na modelação espacial da ocorrência e abundância de *Culicoides imicola* destinadas à produção de cartografia de risco para a LA. Para a construção de ambos os modelos consideraram-se os dados entomológicos nacionais e dados climáticos do pacote WorldClim e do sensor AVHRR do satélite NOAA-15. Os modelos foram depois implementados recorrendo a pacotes estatísticos e SIG.

[Modeling the spatial occurrence and abundance of Bluetongue vectors through the use of Remote Sensing and Geographical Information Systems technologies: comparison between methodologies]

Bluetongue (BT) is an infectious non-contagious disease which affects ruminant animals. Although it does not represent a threat to human health, BT is a disease with high potential of dispersal and can cause serious socio-economical damage.

BT is caused by an arbovirus (BTV) from the *Reoviridae* family and its transmission is commonly associated with an insect of the *Culicoides* genus. *Culicoides imicola* is the main vector of BTV in the Mediterranean Basin. The implementation of entomological surveillance programs allows the continuous collection of vital data to the investigation of spatial and temporal distribution of BT vectors. In Portugal, this program was implemented in May 2005 and provides a considerable amount of information about the spatial distribution and abundance of several *Culicoides* species in the country.

Remote sensing (RS) is the process of acquiring information about a geographical object through several aircrafts or satellites built-in sensors. They record the interaction between objects and electric, magnetic, electro-magnetic and vibrational energy, allowing one to infer on the physical and chemical characteristics of the objects on the surface of the Earth and thus, to characterize and monitor biophysic, climatic and environmental variables which influence the survival, development and dispersion of the several BT vectors.

Spatial modeling is used in epidemiological investigation process and makes use of mathematical approaches (stochastic or deterministic) to simulate the spatial, temporal and spatio-temporal distribution of phenomena through a logical structure of rules and relations.

Through the use of Geographical Information Systems (GIS) and combining data from surveillance programs and remotely sensed variables, it is possible to model and foresee the spatial distribution and propagation of BT vectors. These models allow, therefore, the identification of risk areas for the disease transmission and support the development of appropriate and efficient measures on the sanitary control and disease eradication.

It is intended, to compare two distinct methodologies (logistic regression and discriminant analysis) in the spatial modeling of the occurrence and abundance of *Culicoides imicola* aiming the production of risk cartography for the BT disease. National entomological, climatic (WorldClim package) and remotely sensed (AVHRR sensor from NOAA-15 satellite) data were used to build both models. These models were then implemented through the use of statistical packages and GIS.

The effect of climate on the presence of *Culicoides imicola* in Spain

Vilar, M.J.^{1,2}, Guis, H.², Calvete, C.³, Lucientes, J.⁴, Miranda, M.A.⁵, Baylis, M.²

1 Unidad de Epidemiología y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela

2 LUCINDA group, Veterinary Clinical Science, Faculty of Veterinary Science, University of Liverpool, UK

3 Unidad de Sanidad y Producción Animal, Centro de Investigación y Tecnología, Agroalimentaria (CITA), Gobierno de Aragón, Zaragoza

4 Departamento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

5 Laboratorio de Zoología, Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca

Bluetongue is an infectious, non contagious disease caused by a virus, which replicates in all species of ruminants but severe disease occurs only in sheep. The virus is transmitted between their hosts by biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*). *C. imicola* is the main vector of bluetongue virus in the Mediterranean Basin. In 2004, a national surveillance programme was initiated in order to estimate the spatial distribution of *Culicoides* species, this surveillance suggest that *C. imicola* is the main bluetongue virus vector in Spain. The recent expansion of bluetongue virus is due in part to the recent expansion of *C. imicola*, possibly in response to global warming due to climatic change. The aim of this study was develop statistical models of climatic and bioclimatic variables from Worldclim database, mainly temperature and precipitation, to determine the distributions of *Culicoides* vectors in Spain, and these models could be used to predict the effects of climate change on the future occurrence of the disease. All available data (from published data and reports, and unpublished data provided by the Spanish Bluetongue National Surveillance Program) on the distribution of *C. imicola* were accumulated and classified in two periods of time: the first half of the 1990s and 2004-05. These data were entered into ArcView and SPSS for the spatial and statistical analyses. For both periods, logistic regression was performed to identify the significant climatic variables that influence in the presence of *C. imicola*.

[Efecto del clima sobre la presencia de *Culicoides imicola* en España]

La lengua azul es una enfermedad infecciosa, no contagiosa provocada por un virus, que es capaz de replicarse en todas las especies de rumiantes, pero que solo se manifiesta de manera aguda en algunas razas de ovejas. El virus es transmitido entre los diferentes hospedadores a través de la picadura de los jejenos del género *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*). *C. imicola* es el principal vector del virus de la lengua azul en la cuenca Mediterránea. En 2004, se inició un programa de vigilancia nacional para estimar la distribución espacial de las distintas especies de *Culicoides* en España, sugiriendo que *C. imicola* es el principal vector de la lengua azul en España. La reciente expansión de la lengua azul es debida en parte a la dispersión de *C. imicola*, posiblemente a debido al calentamiento global, consecuencia del cambio climático. El objetivo de este estudio fue desarrollar modelos estadísticos con variables climáticas y bioclimáticas obtenidas de la base de datos Worldclim, precipitación y temperatura principalmente, para determinar las distribuciones de los vectores *Culicoides* en España. Estos modelos podrán ser usados para predecir el efecto del cambio climático en la aparición de la enfermedad. Para el estudio se recopilieron todos los datos disponibles (datos publicados y artículos científicos, y datos todavía no publicados proporcionados por el Programa de Vigilancia Nacional de la Lengua Azul) en la distribución de *C. imicola*. Estos datos fueron agrupados en dos períodos: comienzos de los años 90 y comienzos de los años 2000. Para el análisis espacial y estadístico se utilizó ArcView y SPSS. Para ambos períodos, se realizó una regresión logística para identificar las variables climáticas con mayor influencia sobre la aparición de *C. imicola*.

Control de animales importados a Cataluña desde áreas infectadas por la Lengua Azul

Rosell, R., Casal, J., Napp, S., Selga, I., Alba, A., Molleda, M., Penedes, J., Domingo, M.

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Edificio V, 08193 Bellaterra, Barcelona

La Lengua Azul ha presentado en la última década una gran expansión en Europa Occidental. Para prevenir su aparición, la Generalitat de Catalunya estableció en 2003 un plan de alerta que entre otros aspectos incluye la investigación de todas las partidas de animales procedentes de zonas en las que se han declarado focos de enfermedad y el posterior sacrificio de las partidas en las que se encuentre un animal positivo a PCR. Mediante esta actuación se han detectado varios casos: Tres bovinos en 2003 procedentes de Baleares, 22 ovinos procedentes del Centro de España en 2005, 1 bovino procedente de Francia en 2006 y 3 vacas y cabras procedentes de Holanda y Francia en 2007.

En el año 2008 ha habido un aumento importante del número de animales positivos procedentes de otras zonas de España y Europa: se han analizado un total de 37449 muestras de sangre procedentes de 882 partidas de bovinos y 83 de pequeños rumiantes. En 56 de las entradas de bovinos, se detectó uno o más animales positivos, no detectándose ninguno en las entradas de ovinos y caprinos.

Hasta el 31 de julio, fecha del establecimiento de la vacunación, se encontraron 120 animales en 8 partidas procedentes de Francia y Cantabria. A partir de esta fecha aumentó de manera importante en número de animales positivos detectados. En la presentación se expondrán y discutirán los resultados obtenidos, especialmente durante el presente año.

[Control of animals imported to Catalonia from areas infected by Bluetongue]

Bluetongue has expanded widely in Western Europe in the last decade. To prevent the introduction of bluetongue, the Autonomous Government of Catalonia established in 2003 a contingency plan, which among others includes the a) the investigation of all consignments of animals from areas with declared outbreaks and, b) the subsequent slaughter animals positive by PCR. This system enabled the detection of several cases: Three cattle from the Balearic Islands in 2003, 22 sheep from the Central Spain in 2005, 1 animal from France in 2006 and 3 cows and goats from Netherlands and France and in 2007.

In 2008 there has been a significant increase in the number of positive animals imported from other regions in Spain and Europe. A total of 37,449 serum samples from 882 cattle and 83 of small ruminant batches have been analyzed. In 56 of the cattle batches, one or more positive animals were detected, while none of the batches of lambs or goats gave a positive result.

Until July 31, the date of the establishment of vaccination, 120 positive animals from 8 batches from France and Cantabria region were detected, but after that date the number of positive animals detected increased substantially. During this talk the results of the surveillance, with special emphasis on those obtained in 2008, will be presented and discussed.

Coste de la infección por *Salmonella* en granjas de ponedoras en España

Napp, S., García, I., Allepuz, A., Alba, A., Casal, J.

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Edificio V, 08193 Bellaterra, Barcelona

La salmonelosis es una de las principales zoonosis de transmisión alimentaria tanto en España como la UE. Durante el 2004 – 2005 se realizó un estudio de referencia sobre la prevalencia de *Salmonella* en manadas de aves ponedoras de la especie *Gallus gallus* a nivel Comunitario. La prevalencia encontrada en España de los serotipos Enteritidis y Typhimurium fue del 51,6%, aunque actualmente se ha logrado reducir la prevalencia a niveles bastante más bajos (en torno al 13%). Con el objetivo de reducir esta prevalencia se estableció el Programa Nacional para la Vigilancia y Control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras. Este Programa se basa en el establecimiento de una serie de medidas restrictivas en las explotaciones afectadas, principalmente:

- 1- Destrucción de los huevos producidos por la manada positiva
- 2- Sacrificio de las aves de la manada afectada
- 3- Limpieza y desinfección
- 4- Prohibición de repoblación durante los 7 días posteriores a la limpieza y desinfección

Cada una de estas medidas lleva asociado un determinado coste. Estos costes fueron incluidos en un modelo construido en Excel/@Risk, que permite estimar los costes totales, los costes por granja infectada y los costes por granja para las diferentes Comunidades Autónomas de España.

El coste total por *Salmonella* en España se estimó en 21,7 millones de euros.

El coste medio por granja infectada se estimó en 98.000 euros.

El coste medio por cada granja existente en se estimó en 13.000 euros.

El 35 % del coste total es debido a la destrucción de huevos, el 59% al sacrificio y destrucción de animales, y el resto a limpieza y desinfección (4%) y periodo vacío (2%).

[The cost of *Salmonella* in laying hen farms in Spain]

Salmonellosis is one of the main food-borne zoonoses both in Spain and the EU.

During 2004 – 2005, a baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying flocks of *Gallus gallus* in EU countries was performed. The prevalence of serotypes Typhimurium and Enteritidis found in Spain was 51.6%, although the prevalence has now been reduced to levels close to the 13%. With the aim of reducing the prevalence a National Program for Surveillance and Control of these specific serotypes of *Salmonella* in laying hens was established. This program was based on the establishment of a series of restrictive measures on the affected farms, mainly:

- 1- Destruction of eggs produced by the affected flocks
- 2- Slaughtering of poultry in affected flocks
- 3- Cleaning and disinfection
- 4- Prohibition of restocking during the 7 days after cleaning and disinfection

Each of these measures is associated with a given cost. These costs were included in a model built in Excel / @ Risk, to estimate the total costs, costs per infected farm and costs per farm for the different Autonomous Communities of Spain.

The total cost for *Salmonella* in Spain was estimated at 21,7 million Euros.

The average cost per infected farm was estimated at 98.000 Euros.

The average cost per farm was estimated at 13.000 Euros.

A 35% of the total cost is due to the destruction of eggs, a 59% to the slaughter and destruction of animals, and the rest to the cleaning and disinfection (4%) and prohibition of restocking period (2%).

Estudo prévio para a implantação de um programa de controlo de reprodução em canídeos

Rodrigues, F.M.¹, Gartner, F.², Mendonça, D.²

1 Câmara Municipal de Valongo/Direcção Geral de Veterinária

2 Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

O objectivo deste estudo, único em Portugal, foi determinar a possibilidade de implantação de um programa de controlo reprodutivo em canídeos, avaliando a disponibilidade da população para a esterilização dos seus animais. Devido à diminuição de risco de tumor mamário conferida pela esterilização, foi paralelamente verificada a prevalência desta patologia nesta amostra.

Foram inquiridos 1416 proprietários de canídeos, 1219 que tiveram acesso à campanha oficial de vacinação antirrábica de 2006 e 197 nas clínicas veterinárias do Concelho de Valongo. Foi feita a avaliação clínica para diagnosticar nódulos sugestivos de tumor mamário.

Verificou-se uma taxa baixa de animais esterilizados (4,9%), 1% nos machos e 10,5% nas fêmeas. Apenas 22,5% dos Municípios apoiam e reconhecem as suas vantagens. A maioria (48,6%) desconhece as suas vantagens e 28,9% opõe-se à esterilização, principalmente por a considerar errada e antinatural.

A taxa mais elevada de esterilização de animais está associada a um estrato social com rendimento médio-alto, com maior instrução e com profissões mais especializadas. Pelo contrário, a menor taxa de esterilização de animais e a maior percentagem de oposição à esterilização relaciona-se com estratos sociais de menores recursos financeiros e que habitam áreas rurais.

Perante estes resultados, parece-nos imprescindível o investimento em campanhas educativas e de promoção do controlo reprodutivo.

A prevalência de nódulos mamários estimada por palpação das cadeias mamárias em todos os animais avaliados, 2,6% (n=33), verificando-se estar estatisticamente associada aos factores sexo e idade do animal.

[Prior study for the introduction of a birth control program in dogs in Portugal]

The purpose of this study, unique in Portugal, was to determine the possibility of introduction of a birth control program, evaluating the availability of the population for the sterilization of their animals. Due to the reduction of risk of mammary tumor conferred by the sterilization, it was also found the prevalence of this disease.

In this study were surveyed 1416 dog owners, 1219 in the official anti-rabic vaccination campaign and 197 in the veterinary clinics of Valongo Council. Their animals were evaluated to diagnose mammary tumor.

The rate of sterilized animals was (4.9%), 1% in males and 10.5% in females. The sterilization is not a recurrent act among the population because only 22.5% of the population support and recognize the benefits. Most of the inquired people (48.6%) don't know the advantages and 28.9% are against the sterilization, mainly because they consider it a wrong option and an anti-natural way to solve this issue.

The higher rate of animals sterilization is related to medium-high incomes, to higher educational level and to more specialized professions. In opposite, the lowest rate of sterilization and the highest rate of opposition to sterilization is related to lower social strata, with lower financial resources and to rural areas.

These results show that it seems essential the investment in educational and economical campaigns to promote reproduction control.

The prevalence of mammary nodules was 2.6% (n=33) and have been statistically linked to the gender and age of the animal.

Enfermedad de Crohn y ganadería de rumiantes. ¿Tiene lactasa?

Juste, R.A.

Neiker-Tecnalia

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y, más específicamente la enfermedad de Crohn (CD) es un proceso patológico crónico bien conocido, cuya etiología se ha mantenido desconocida durante casi un siglo. Mecanismos inmunes complejos en un fondo genético específico que causan una respuesta inflamatoria local anormal se piensan que son los responsables directos del cuadro clínico, pero no se ha identificado ningún factor externo que desencadene dichas respuestas. Los humanos pierden su capacidad de degradar la lactosa en una edad temprana y, posteriormente, la ingestión de grandes cantidades de leche les causa una enfermedad digestiva transitoria que se conoce como intolerancia a la lactosa. Algunas poblaciones humanas desarrollaron mutaciones de persistencia de la actividad de la lactasa en la edad adulta que les permitió explotar mejor un recurso, la leche, de especies domésticas que no compiten directamente con ellas en el uso de recursos alimentarios. Los análisis de correlación y regresión múltiple muestran una fuerte asociación entre la incidencia nacional de la CD y la frecuencia de la persistencia de la lactasa. La asociación de la incidencia de la CD con otras variables productivas y de consumo, así como con variables económicas apoyan el significado de dichos resultados. La asociación de estas variables con rentas per cápita más elevadas sugiere que la incidencia de la IBD podría ser un efecto colateral de una adaptación muy beneficiosa. El escenario evolutivamente plausible proporcionado por esta asociación con la especie que sufre una enfermedad inflamatoria similar, su coincidencia con la expansión de una raza bovina que podría actuar como un caballo de Troya, así como las recientes observaciones sobre variables terapéuticas, inmunológicas y microbiológicas consistentes con un tipo de patogenia de infección lenta, apoyan más solidamente una etiología micobacteriana para la IBD humana. La confirmación de una etiología compartida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la IBD humana y de los rumiantes mediante una terapia antibiótica o inmunitaria eficaz en paralelo con la puesta en marcha de medidas de control eficaces de la paratuberculosis de los rumiantes parece ser el obvio siguiente paso que debería conducir a la validación de esta hipótesis y a acercar la erradicación de una causa de sufrimiento humano y animal.

[Crohn's disease and ruminant farming. Got lactase?]

Human inflammatory bowel disease (IBD), and more specifically Crohn's disease (CD) is a well known chronic pathological condition whose aetiology has remained unrecognized for nearly a century. Complex immune mechanisms in an specific genetic background causing an abnormal local inflammatory response are thought to be directly responsible for the clinical picture, but no external factor triggering such host responses has been identified. Humans lose the capability of breaking down milk lactose early in life and, afterwards, ingestion of large amounts of lactose causes a transient digestive illness known as lactose intolerance. Some human populations developed mutations for lactase persistence in adulthood that allowed better exploiting a product, milk, from non-food competitive domesticated species.

Correlation and multiple regression analyses show a strong association between country incidence of CD and frequency of lactase persistence. Association of CD incidence with other agricultural production and consumption, as well as economic variables further support the meaning of these results. Association of these variables with higher per capita income suggests that IBD incidence could be a side-effect of an otherwise highly successful adaptation.

The evolutionarily plausible scenario furnished by this association with the species suffering a similar inflammatory bowel disease (IBD), its coincidence with the expanse of a cattle breed that could act as a Trojan horse, in addition to recent observations on microbiological, immunological and therapeutic variables consistent with a slow infection type of pathogenesis, strongly supports a mycobacterial aetiology of human IBD. Confirmation of a shared aetiology by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of human and ruminant IBD by an effective antibiotic or immune aetiological therapy in parallel with implementation of efficient control measures for paratuberculosis in ruminants seems the obvious next step that should lead to validate our hypothesis and to bring closer the eradication of a cause of human and animal suffering.

O sector leiteiro no Continente Português: desafios e oportunidades

Beira, S.C.R.¹, Mendonça, J.S.L.¹, Baptista, R.M.L.N.¹, Niza Ribeiro, J.J.R.²

¹ Instituto Superior Técnico, TULisbon

² Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

Este trabalho estuda o subsector da produção de leite bovino em Portugal continental, no âmbito das futuras alterações da Política Agrícola Comum, condicionado por um elemento contextual imposto exogenamente – a abolição das quotas leiteiras. Actualmente, o subsector nacional apresenta um panorama menos competitivo que noutros países da Comunidade Europeia. A inovação poderá ter um papel muito importante, por proporcionar vantagem competitiva nos mercados globais. A metodologia utilizada tem por base a Técnica Prospectiva. São realizadas entrevistas a pessoas de diversas organizações envolvidas no sector, uma análise SWOT, um mapeamento dos factores chave e um estudo comparativo entre dois cenários: condição ceteribus paribus e aumento da procura mundial por produtos lácteos.

Os factores chave identificados são: a eco-condicionalidade, a estrutura da exploração e dos factores de produção, a evolução da PAC, a evolução da oferta e da procura dos produtos lácteos, a importância da distribuição, o perfil do agricultor, o perfil do sector, a adaptação tecnológica das explorações, o desenvolvimento e transferência de conhecimento, a criação de objectivos estratégicos para o sector, a estrutura do sector e a educação do consumidor.

São identificados desafios e oportunidades para o sector do leite em Portugal e estabelecidas estratégias políticas futuras.

[The Dairy Sector in Portugal inland: challenges and opportunities]

This work focuses on the dairy sector in Portugal inland, more precisely on the raw milk production subsector, in the pre-established context of the raw milk quota abolishment.

At the present time, this subsector has a weak performance compared with other European countries. Innovation will have high importance to the sector development because it improves competitiveness in a global market.

It uses the foresight technique. Some interviews are performed to people from several organizations involved in the sector, as well as a SWOT Analysis, a Key Factor Roadmapping and a Comparison Study between two scenarios: ceteribus paribus and higher world demand for dairy products.

The keys factors identified are: environment-related issues, holding structure, evolution of CAP, evolution of dairy products demand and supply, distribution structure, farmers profile, sector profile, farms technical skills, development and transfer of knowledge, establishment of strategical goals, sector structure, actions to educate consumers.

Based on this future vision, it is possible to assess the challenges and opportunities the Portuguese dairy sector faces, as well as future policy implications.

Influencia del equipo de muestreo en la variación de grasa y proteína en muestras de leche bovina

Fouz, R.¹, Yus, E.², Sanjuán, M.L.², Diéguez, F.J.^{2,3}

1 Asociación provincial para el control de rendimientos (AFRICOR), Lugo

2 Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.

3 Dpto. de Anatomía y Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela

Se evaluó la influencia del tipo de equipo de toma de muestras utilizado en explotaciones integradas en Control Lechero sobre el porcentaje de grasa y proteína de la leche. El estudio fue realizado a partir de los datos recogidos en 2.149 explotaciones de ganado vacuno lechero situadas en la provincia de Lugo (Galicia, España), en las cuales el muestreo de Control Lechero se realizó con equipos electrónicos, portátiles o volumétricos. Se calculó la producción de leche por lactación (61.020 lactaciones finalizadas en 2006), así como los valores medios de grasa y proteína (método Fleischmann) de cada una de las lactaciones a partir de los resultados obtenidos mediante espectroscopía infrarroja. Los resultados más concluyentes se obtuvieron en el caso de la grasa, observándose diferencias significativas al comparar cada tipo de equipo de muestreo, así como que el efecto del equipo de toma de muestras sobre el porcentaje de grasa varía en función de la producción. El modelo total explicó un 46,7% de la variabilidad total de los porcentajes de grasa.

[Influence of the sampling equipment in the variation of fat and protein in samples from bovine milk]

The influence of the equipment of samples collection used in farms integrated to Dairy Recording Systems on the fat and protein percentage of the milk was assessed. The study was carried out from the information gathered in 2.149 dairy farms placed at Lugo (Galicia, N W Spain), in which the sampling of Dairy Recording was realized by electronic, portable or volumetric equipments. The milk production was calculated by lactation (61.020 lactations finished in 2006), as well as the average values of fat and protein (Fleischmann method) of each lactation from the results obtained by means of infrared spectroscopy. The most conclusive results were obtained in the case of the fat; significant differences was observed when compared the different types of sampling equipment. Besides, the effect of the equipment of capture of samples on the percentage of fat changes depending on the production. The total model explained 46,7 % of the total variability of the fat percentage.

Linfoma maligno no cão em Portugal: estudo anatomopatológico e imunohistoquímico

Correia, Jorge Jesus

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

No presente trabalho procedeu-se ao estudo do Linfoma Maligno em canídeo doméstico (*Canis familiaris*), utilizando técnicas que permitiram aprofundar os conhecimentos fundamentais para o diagnóstico da doença e contribuir para a melhor compreensão do processo patológico das várias entidades nosológicas que a neoplasia pode assumir.

Procedeu-se igualmente ao estudo da casuística disponível no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária abrangendo o período de 1947 a 2002. No total foram avaliados os resultados de 13.507 análises anatomopatológicas, tendo-se procedido à identificação dos casos de neoplasia, dos quais 535 eram LMCs. Estes foram classificados quanto à idade, sexo, raça e forma anatómica lesional.

Efectuaram-se ainda exames necrópsicos num total de 48 canídeos com LMCs, tendo sido realizado o estudo histopatológico num total de 53 casos, incluindo os necropsiados. Através do estudo histopatológico foi possível identificar os diferentes tipos de linfoma, tais como o folicular, o folicular/difuso e difuso, cuja incidência veio a revelar-se distinta da referenciada na bibliografia. Quanto ao tipo celular identificaram-se LMCs linfocíticos, linfoplasmocíticos, tipo manto, centroblastico/centrocíticos, imunoblásticos, centroblasticos, linfoma de células grandes indiferenciadas e tipo Burkitt. É de referir que estes casos de LMC de tipo Burkitt foram objecto da primeira descrição deste tipo de linfoma em Portugal.

Em 36 dos casos estudados empregaram-se técnicas de imunohistoquímica, identificando-se os fenótipos B/T com os marcadores monoclonais de células B (BLA.36 e CD79 α) e policlonal de células T (CD3). Esta técnica permitiu identificar 15 tipos distintos de LMCs.

Os LMCs tipo Burkitt, tipo manto e digestivo foram caracterizados mais detalhadamente recorrendo aos seguintes marcadores: CD5, CD10, BCL-2, TdT, CAM 5.2 e Ciclina D1.

Três dos LMCs com morfologia de centroblasto revelaram fenótipo T, o que é contrário ao descrito na literatura. Realizou-se ainda uma avaliação do seu índice proliferativo comparativamente com os LMCs centroblasticos de tipo B, através da marcação com Ki-67.

Finalmente, o período de sobrevivência em diversos casos de LMC foi relacionado com os factores seguintes: grau de malignidade, fenótipo e idade.

Financiamento: Projecto CIISA/30.LINFOMA (Conducente a Tese de Doutoramento).

[Canine malignant lymphoma in Portugal: anatomopathologic and immunohistochemical study]

In the present work Canine Malignant Lymphoma was studied using various techniques that provided significant contributions to a deeper knowledge on the pathology of this neoplasia.

The pathology archives of the Laboratory of Pathological Anatomy in Veterinary Medicine Faculty were used in order to revise 13.507 cases of canine anatomopathological exams made from 1947 to 2002. Neoplastic cases were identified and 535 diagnosed as CMLs. These were classified with reference to age and lesional anatomical form.

Necropsy exams were performed in 48 CMLs cases from 1996 to 2001. Histopathological analysis was accomplished in a total of 53 cases, including the 48 necropsied. These cases allowed for the identification of various types of lymphoma such as folicular, folicular/diffuse and diffuse, which frequency revealed consistent differences from published data in the consulted bibliography. Lymphocytic, lymphoplasmacytic, mantle type, centroblastic/centrocytic, immunoblastic, centroblastic, large undifferentiated cells lymphoma and Burkitt-type CMLs were identified by citological evaluation.

Immunohistochemical techniques were applied in 36 cases of CML. B/T phenotypes are identified with B-cell monoclonal (BLA.36 and CD79 α) and T-cell policlonal (CD3) markers. Fifteen different CMLs types were identified.

Burkitt-type and digestive CMLs were characterized in full detail through phenotyping with the following markers: CD10, BCL-2, TdT and CAM 5.2.

Three CMLs with centroblastic morphology reveal a T cell phenotype, which is contrary to previous reports. An evaluation of its proliferative index was achieved through Ki-67 phenotyping in comparison to B centroblastic-type CMLs.

The survival period of the cases studied was evaluated regarding the following factors: malignancy degree and phenotype.

This work was financially supported by: CIISA/30.LINFOMA (FMV-UTL).

Estudo do potencial proliferativo e invasivo de carcinomas do endométrio em gata

Pires, M.A.¹, Ribas, J.², Augusto, C.², Payan-Carreira, R.¹

¹ CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

² Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

Os tumores uterinos em gatas são de ocorrência rara, representando cerca de 0,29% das neoplasias nestes animais. Os tumores uterinos mais comuns são os de origem muscular, enquanto que os tumores de origem epitelial são muito mais raros, o que dificulta o conhecimento do seu comportamento. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a expressão de marcadores celulares (Ki-67, MMP-9 e TIMP-1) com o objectivo de determinar a capacidade proliferativa e a agressividade de dois tipos morfológicamente distintos de carcinomas do endométrio de gata, através da técnica de imunohistoquímica. As amostras de carcinoma foram avaliadas e classificadas em carcinoma diferenciado (Grupo I; n=3) e em carcinoma de tipo microglandular (Grupo II; n=3). Como controlos utilizaram-se amostras de endométrio na fase proliferativa (n=5) e na fase secretora (n=5) do ciclo éstrico. Das amostras, fixadas em formol tamponado a 10% e incluídas em parafina, foram realizados cortes com 2 µm, para coloração de rotina com hematoxilina-eosina, para avaliação morfológica, e para a realização de imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Dois avaliadores independentes realizaram uma avaliação cega da marcação. Os resultados da marcação para a MMP-9 e TIMP-1 foram avaliados em negativo ou positivo, sendo neste último caso classificados de acordo com a intensidade de marcação entre fraca (+) e forte (+++). Foi também avaliado o padrão de expressão em membranas, citoplasmático e nuclear, sendo estes dois últimos considerados padrões aberrantes. O índice proliferativo avaliado pela marcação com o Ki-67 foi expresso em percentagem, por contagem do número de células positivas em 10 áreas representativas do tumor.

Em ambos os tipos de carcinomas do endométrio foi evidente um aumento da expressão de MMP-9, em simultâneo com um decréscimo da expressão de TIMP-1. Esta alteração da expressão foi responsável pela inversão da proporção MMP-9/TIMP-1 relativamente aos controlos. Foi ainda encontrada uma diferença marcada entre a proporção MMP-9/TIMP-1 entre os dois tipos de tumores: esta relação é de 4:1 nos carcinomas do grupo I mas de apenas 1,9:1 nos carcinomas do grupo II, sendo nos controlos de 1:4,5 e de 1:3,5 nas fases proliferativa e secretora, respectivamente. O índice de Ki-67 foi 2,4% nos carcinomas do grupo I e 23,9% nos do grupo II.

Os resultados encontrados indicam a existência de uma maior capacidade proliferativa nos tumores do grupo II, embora a relação MMP-9/TIMP-1 aponte para uma menor capacidade invasiva. O inverso foi encontrado relativamente aos tumores do grupo I, que aparentam possuir um menor potencial de crescimento embora pareçam existir indícios de um maior potencial invasivo.

Os dados deste estudo permitiram uma melhor caracterização do carcinoma do endométrio da gata, demonstrando que, quer pelo seu aspecto morfológico, quer no que respeita a índices proliferativos e de comportamento invasivo, poderemos afirmar que existem dois tipos diferentes deste tumor.

[Study of invasiveness and proliferative indices in feline endometrial carcinomas]

Feline uterine tumors represent only 0.29% of all reported neoplasm in this species. Whereas the most frequent tumours are smooth muscle-derived tumors, epithelial endometrial tumours are rare and remain poorly understood. In this work, a panel of immunomarkers (Ki-67, MMP-9 and TIMP-1) was applied in two different groups of endometrial carcinomas, to study tumors characteristic of invasiveness and cellular differentiation. Carcinomas specimens were selected from the UTAD histopathology laboratory collection, and classified according to its morphological characteristics in well-differentiated endometrial carcinoma with a papillary pattern (group I, n=3) or in microglandular carcinoma (Group II, n=3). As controls, samples from feline endometria at the proliferative (n=5) and at the secretory (n=5) stages of oestrous cycle were used. Samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin wax, were sectioned at 2 µm and routinely stained with haematoxylin and eosin to morphological characterization. Immunohistochemical analysis was performed using the avidin-biotin peroxidase method. Two independent observers performed a blind assessment of the degree of staining. The results for MMP-9 and TIMP-1 were evaluated as negative and positive immunolabeling with different intensity as (+) to (+++). For MMP-9 and TIMP-1 the cellular immunolabeling pattern was further classified as cytoplasmic, membranar or nuclear, these as aberrant staining. Proliferative index was determined using Ki67 antibody. The number of immunopositive cells to Ki67 in 10 representative areas at the tumor was expressed as percentage (proliferative index).

Whereas in both types of endometrial carcinoma a decrease in TIMP-1 was observed, MMP-9 showed a strong increase of expression, provoking the inversion of MMP/TIMP ratios regarding the one observed in normal endometria. In addition, differences were noticed between the two groups of tumours: MMP-9/TIMP-1 ratios was 4:1 for group I carcinoma, while it was 1.9:1 for group II carcinoma. For controls, this ratio was 1:4.5 and 1:3.5 for the proliferative and the secretory stages, respectively. The Ki-67 index found for these tumors was 2.4% for group I carcinoma and 23.9% to the group II. The higher proliferative index presented by group II carcinomas may be associated with a bigger ability to growth of this carcinomas' group. The MMP-9 and TIMP-1 results suggests that group I endometrial carcinomas has more invasion potential than the group II, and that the later one is more proliferative than group I.

Data obtained in this study allowed a better characterization on the potential proliferative and invasive behavior for the feline endometrial carcinoma, and confirm the existence of two different types of these tumours.

Tumores testiculares no coelho e no gato – estudo de três casos

Silva, J.F., Afonso, F., Pinho, M., Pissarra, H., Peleteiro, M.C.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Nas espécies humana e canina os tumores testiculares são frequentes (1). Pelo contrário, no gato, estes tumores são raros, em parte devido à castração quase sistemática a que os machos são submetidos, e em parte devido a possíveis particularidades fisiopatológicas relativas a esta espécie (2). No coelho, as neoplasias testiculares são pouco referidas, sendo consideradas raras (3).

Apresentam-se três casos de tumores testiculares, dois em coelhos e um num gato; as peças para exame histopatológico foram colhidas por orquiectomia e processadas pela técnica histológica de rotina (fixação em formol a 10%, inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina e eritrosina):

1. Coelho, 7 anos, com um testículo hipertrofiado (eixo maior – 5 cm) e superfície de corte branca e de aspecto atoucinhado. O exame histológico revelou um seminoma difuso com focos de necrose. Este animal apresentava também um tricoblastoma na pele da região costal direita.

2. Coelho anão, 4 anos, testículo esquerdo hipertrofiado (5,5 x 3,5 x 2,5 cm), testículo direito sem alterações aparentes (2 x 1 x 0,5 cm). No exame microscópico, o testículo esquerdo apresentava um seminoma difuso com focos de necrose; o testículo contralateral não mostrava alterações significativas.

3. Gato, Europeu Comum, idade não indicada, com um testículo aumentado de volume (3,5 x 2 cm). O exame histológico revelou um sertolinoma intratubular, moderadamente diferenciado, com 3,3 mitoses por campo em grande ampliação (objectiva x40), notando-se algumas figuras de apoptose e invasão do epidídimo.

O sertolinoma do gato, devido ao número elevado de mitoses e ao crescimento infiltrativo, terá fortes possibilidades de ser maligno. Um outro caso de sertolinoma maligno em gato foi descrito por um dos autores da presente comunicação (2).

Referências: 1. Grieco V, Riccardi E, Greppi GF, Teruzzi F, Iermanò V & Finazzi M (2008). Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 138: 86-89. 2. Silva JF (2002). Sertolinoma maligno em testículo ectópico de gato (*Felis catus*). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97 (542): 87-92. 3. Maratea KA, Ramos-Vara JA, Corriveau LA & Miller MA (2007). Testicular interstitial cell tumor and gynecomastia in a rabbit. *Veterinary Pathology*, 44: 513-517.

[Testicular tumours in the rabbit and cat - report of three cases]

Testicular tumours are frequent in human and canine species (1). Contrarily, these neoplasms are rare in the cat, partly because of the almost systematic castration tomcats are subjected to, and partly because of possible physiopathologic peculiarities inherent to these felines (2). In the rabbit, testicular neoplasms are seldom reported, and possibly rare (3).

Three cases of testicular tumours are presently reported, two occurring in rabbits and one in a cat; the histopathologic material was collected by orchietomy and processed according to routine histologic microtechnique (fixation in 10% formalin, embedding in paraffin and haematoxylin and erythrosin staining)

1. Rabbit, 7 years old, with an hypertrophied (major axis – 5 cm) testis showing white lardish cut surface. Histopathologic exam disclosed a diffuse seminoma with necrosis foci. This animal also harboured a trichoblastoma in the skin of the right costal region

2. Midget rabbit, 4 years old, with hypertrophied left testis (5,5 x 3,5 x 2,5 cm), right testis with no macroscopic alterations (2 x 1 x 0,5 cm). Microscopically, the left testis harboured a diffuse seminoma with foci of necrosis, while the contralateral testis had no microscopic alterations.

3. European cat, age not specified, showing a hypertrophied testis (3,5 x 2 cm). Histologic exam disclosed a moderately differentiated intratubular Sertoli (sustentacular) cell tumour, with 3,3 mitoses per high-power field (x40 objective); there were some apoptotic bodies and epididymal infiltration was noted.

Due to high mitotic figure number and infiltrative growth pattern, the feline sustentacular cell tumour was possibly malignant. Another case of malignant Sertoli cell tumour in cat was described by one of the authors (2).

Bibliography: 1. Grieco V, Riccardi E, Greppi GF, Teruzzi F, Iermanò V & Finazzi M (2008). Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 138: 86-89. 2. Silva JF (2002). Sertolinoma maligno em testículo ectópico de gato (*Felis catus*). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97 (542): 87-92. 3. Maratea KA, Ramos-Vara JA, Corriveau LA & Miller MA (2007). Testicular interstitial cell tumor and gynecomastia in a rabbit. *Veterinary Pathology*, 44: 513-517.

Expressão de c-kit e de MMP-9 em 38 casos de proliferação de mastócitos (mastocitoma e mastocitose) em gato

Rafael, T.¹, Pissarra, H.¹, Santos, C.², Carvalho, T.³, Correia, J.¹, Silva, J.F.¹, Afonso, F.¹, Peleteiro, M.C.¹

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Laboratório de Anatomia Patológica, Hospital de S. José, Lisboa

3 Centro de Investigação em Patobiologia Molecular, Instituto Português de Oncologia, Rua Prof. Lima Basto, 1099-023 Lisboa

As proliferações de mastócitos em felinos podem constituir desde nódulos bem delimitados formados por células bem diferenciadas a lesões difusas com os mastócitos infiltrando os tecidos de forma dispersa, neste caso geralmente associadas a resposta inflamatória exuberante. Ainda neste último caso, pode surgir dificuldade no diagnóstico diferencial relativamente à placa eosinofílica e à dermatite alérgica. Com o objectivo de melhor conhecer as proliferações de mastócitos em gatos, procedeu-se à recolha de material de arquivo correspondendo a 38 casos de proliferação exuberante de mastócitos, recebidos para diagnóstico desde Janeiro de 2003 no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. O material utilizado neste trabalho foi fixado em formol a 10%, incluído em parafina, e os cortes corados pela hematoxilina e eosina e azul de toluidina.

Os casos seleccionados foram analisados quanto à idade, sexo e raça dos felinos, localização da lesão, características macro e microscópicas, tendo sido recolhidos os dados possíveis relativos à evolução clínica após cirurgia ou biópsia. A idade média foi de 7 anos (mínimo 2, máximo 16). O sexo foi desconhecido num gato, feminino em 17 (9 castradas) e masculino em 20 (8 castrados). Vinte e cinco felinos não tinham raça definida. Nos de raça pura predominou a Persa com oito casos (21%), seguida de dois Siameses e dois Bosque da Noruega. A localização era cutânea em 87% dos casos (n=33), no lábio em 2 casos, registando-se ainda três situações de localização na vulva, na parede gástrica e no mesentério. A classificação histológica foi simples e incontroversa em metade dos casos (n=19, 50%), tendo-se revelado mais complexa nos restantes 50%. Neste grupo, diagnosticou-se mastocitomas pleomórficos em 10 casos (26%) e mastocitose em 5. No caso particular dos mastocitomas gástrico e da vulva foi relevante a presença exuberante de tecido fibroso no qual se dispersavam as células tumorais. Em apenas um mastocitoma, localizado no lábio, registou-se infiltração epitelial.

Com o objectivo de identificar padrões de diferenciação e de comportamento dos mastócitos, 15 casos foram seleccionados para identificação por imunohistoquímica indirecta de padrões de marcação para o CD117, produto proteico do proto-oncogene c-kit, e para metaloproteínases da matriz, concretamente a MMP-9. Foram utilizados como anticorpos primários os soros policlonais de ovino anti-CD117 da Dako e anti-MMP-9 Ab9 da Thermo Scientific, após recuperação antigénica com EDTA no primeiro caso e com tampão citrato no segundo. Os resultados obtidos evidenciam diferenças discretas entre os vários tipos de proliferação de mastócitos, sendo os mesmos discutidos à luz dos conhecimentos actuais sobre o significado dos marcadores utilizados.

[C-kit and MMP-9 immunoreactivity in 38 cases of mast cell proliferation (mast cell tumours/mastocytosis) in the cat]

Mast cell proliferations in feline may assume various patterns, varying from small individualized nodules formed by well differentiated cells to diffuse lesions, with multifocal to diffuse mast cell infiltration, usually associated to severe inflammation. In the latter, differential diagnosis to feline eosinophilic plaque and feline allergic dermatitis may be difficult. In order to increase the knowledge on these mast cell proliferations, 38 cases were selected from the archives of the Faculty of Veterinary Medicine of the Technical University of Lisbon, received for diagnosis from January 2003 up to now. Samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sections stained by hematoxylin and eosin and toluidine blue. The selected cases were analysed regarding age, sex and breed of the cats, location of the lesions, gross and microscopic characteristics. Data were collected whenever possible regarding the clinical evolution after surgery or biopsy. Mean age was of 7 years, age range being 2 to 16. Sex was unknown in one case, with 17 females (9 sterilized) and 20 males (8 sterilized). Twenty five cats had no specified breed; eight were Persian, three Siamese and two Norwegian Forest cats. Location was cutaneous in 87% of the cases (n=33), in the lip in two cases, and in three additional isolated situations lesions were located in vulva, stomach and mesenterium. Histological classification was simple and uncontroversial in half the cases (n=19, 50%), being more complex in the remaining 50%. Pleomorphic mast cell tumours were identified in ten cases and mastocytosis in five. In the particular cases of the vulva and stomach an exuberant fibrous tissue component was registered. There was epithelial infiltration only in a single case, one of the lesions in the lip. To identify patterns of differentiation and behaviour, 15 cases were selected for indirect immunohistochemistry to CD117, the protein product of the proto-oncogene c-kit, and MMP9, a matrix metalloproteinase. Primary antibodies were both ovine polyclonal, from DAKO and Thermo Scientific, respectively. Antigen retrieval was achieved with EDTA and citrate buffer, respectively. The results obtained show discrete differences of the various types of mast cell proliferations, which are discussed according to what has been reported by other authors regarding the markers used.

Variações entre patologistas na gradação dos mastocitomas cutâneos caninos

Oliveira, J.P.

Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

Os mastocitomas cutâneos são das neoplasias mais comuns do cão. Estes tumores têm um comportamento biológico muito variável, desde benignos a altamente malignos e metastáticos. Há mais de 30 anos que a gradação histológica é usada para indicar o prognóstico dos mastocitomas caninos. O sistema de gradação correntemente usado, de Patnaik e colaboradores, classifica os mastocitomas em 3 graus. Os de grau I, benignos são, por norma, curáveis por excisão. Os mastocitomas de grau 3, fracamente diferenciados, são localmente invasivos, com fortes probabilidades de metastizar e associados com um mau prognóstico. A aparência histológica e o comportamento clínico dos mastocitomas de grau II variam entre os outros dois graus. Devido à importância da gradação na decisão de tratamento e estadiamento dos mastocitomas é importante saber a variação entre patologistas na gradação histológica dos mesmos. Assim, o objectivo deste trabalho é averiguar a variabilidade individual entre patologistas de oito instituições, na classificação de 10 mastocitomas. Estes foram retirados do arquivo do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD. A cada instituição foram enviadas lâminas, coradas com HE, de cada caso, sendo pedido que avaliassem os tumores de acordo com a gradação de Patnaik e colaboradores (e da OMS). Os cortes foram previamente avaliados para confirmar o diagnóstico e a qualidade da coloração. A concordância entre os resultados das diferentes instituições foi avaliada estatisticamente.

Similar ao estudo apresentado aqui, outros estudos foram efectuados quer em mastocitomas caninos quer em outras neoplasias animais e humanas no intuito de desenvolver esforços para o desenvolvimento de sistemas de gradação com grande reproducibilidade e implicação prognóstica.

[Variations among pathologists in histological grading of canine mast cell tumors]

Mast cell tumors are the most common cutaneous neoplasm of the dog. These tumors vary widely in their behavior from nearly benign to highly invasive and metastatic. It has been recognized for more than 30 years that histological grading is prognostic for the behavior of canine cutaneous MCTs. The most widely recognized grading system classifies MCTs into 3 grades. Well-differentiated, low-grade (Patnaik Grade I) MCTs are generally benign in behavior and are usually cured by surgical excision. Poorly differentiated, high-grade (Patnaik Grade III) MCTs are generally locally invasive, more likely to metastasize, and associated with a poor survival rate. The histologic appearances and clinical courses of intermediate-grade MCTs range between those of high- and low-grade MCTs. Because of the importance of histologic grade in the decision-making process involving staging and treatment of canine cutaneous MCTs, it is of value to know whether variability exists among pathologists in assigning grades to MCTs. The goal of this study was to evaluate variability in histologic grading of canine cutaneous MCTs among veterinary pathologists from 8 institutions. 10 mast cell tumors were retrieved from the archives of UTAD laboratory. Each institution was provided with a stained HE slide from each mast cell tumor, and asked to grade the tumors according to Patnaik's classification. Slides were reviewed to confirm diagnosis and adequacy of sections and staining for evaluation.

Similar to the study presented here, other studies were made in canine mast cell tumors in other malignancies, both animals and humans, reflecting the interest of oncologists to better understand the variability in existing grading systems and direct efforts toward developing grading systems for cancer that might offer greater reproducibility and prognostic power.

Expressão de galectina-3 em tumores mamários caninos

Oliveira, J.T.^{1,2}, Gomes, J.², Matos, A.J.1,², Bernardes, E.², Gartner, F.^{1,2}

1 IPATIMUP, Universidade do Porto

2 Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

Os tumores mamários caninos (TMC) afectam maioritariamente animais mais velhos e compreendem aproximadamente entre 25-50% de todos os seus tumores, 40 a 50% destes são malignos. A galectina-3 encontra-se expressa no cancro da mama da mulher e contribui para a progressão tumoral. A expressão de galectina-3 tem vindo a ser associada a um pior prognóstico. O papel desta galectina e da sua interacção com o sistema imune ainda não foi descrito em TMC e no seu processo metastático. O objectivo deste trabalho foi analisar a expressão da Galectina-3 em TMC e em linhas celulares de TMC num contexto in vivo e in vitro.

Métodos: A cultura das linhas celulares CMTU27, CMM115, CMM26 e CMA07 foi efectuada em meio RPMI 1640 com HEPES e Glutamax-1 suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina e mantida a 37 °C numa atmosfera suplementada de 5% CO₂. Extracção proteica e Western Blot. As células foram lisadas e o conteúdo proteico foi quantificado através de métodos standard. O extractos proteicos foram analisados por SDS-PAGE standard, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com um anticorpo monoclonal contra a galectina-3. Ensaio in vivo. Uma suspensão celular de 10⁶ da linha CMTU27 foi inoculada no pâncreo mamário de fêmeas de ratinho N:NIHY(s)II-nu/nu com 6 semanas de idade. Os tumores e os órgãos metastáticos foram removidos em tempos diferentes. Imunohistoquímica. Secções em parafina dos TMC e dos tumores e órgãos dos ratinhos foram analisados através da técnica de imunohistoquímica.

Resultados: As linhas CMTU27 e CMA07 apresentavam níveis de expressão semelhantes de galectina-3 enquanto que as linhas CMM115 e CMM26 embora semelhantes entre si apresentavam níveis bastante mais elevados de galectina. Todos os TMC analisados revelaram expressão de galectina-3. Nos tumores de ratinhos verificou-se expressão de galectina-3 em menos de 5% das células adjacentes a zonas de necrose, nas suas metástases observou-se expressão de galectina-3 apenas em embolos tumorais presentes em vasos.

Conclusões: Embora todas as linhas celulares estudadas expressem galectina-3 têm níveis diferentes da proteína e a expressão de Galectina-3 foi diferente num contexto in vivo e in vitro. A perda de expressão verificada nos TMC está de acordo com a literatura, sendo que uma sobexpressão de Galectina-3 tem vindo a ser associada a um pior prognóstico em cancro da mama da mulher. Os nossos achados parecem indicar pela primeira vez em TMC que a galectina-3 pode ter o mesmo comportamento biológico estudado para o cancro da mama podendo constituir assim um alvo terapêutico promissor para imunoterapia em TMC.

[Galectin-3 expression in canine mammary tumours]

Canine mammary tumours affect mainly older bitches and comprise approximately 25-50% of all their tumours, 40-50% being malignant [1,2]. Galectin-3 (Gal-3) is expressed in human breast cancer and contributes to carcinoma progression. Gal-3 expression is linked to a poorer prognosis. The role of the immune system interaction with Gal-3 has not yet been described in canine mammary tumours (CMT) and in their metastatic process.

The aim of this work was to assess the expression of Gal-3 in a previously established canine malignant mammary tumour cell line in an in vitro, and an in vivo context.

Methods: Cell culture. CMTU27, CMM115, CMM26 and CMA07 were cultured in RPMI 1640 medium with HEPES and Glutamax-1 supplemented with 10% foetal bovine serum and gentamycin and kept at 37 °C in 5% CO₂ supplemented atmosphere. Protein extraction and western blot. Cells were lysed and the protein content was measured using standard methods. Protein extracts (50 µg) were analysed by standard SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences), and blotted with anti-Gal-3 monoclonal antibody. In vivo assay. Six weeks old female N:NIHY(s)II-nu/nu mice were inoculated subcutaneously in the fat mammary pad with a suspension of 10⁶ of CMTU27 cells. Tumours and metastatic target organs were removed at different times. Immunohistochemistry Paraffin tumour and organ sections of the mice and CMMT paraffin tumour and metastasis sections from the files of ICBAS-UP were examined for Gal-3 immunostaining.

Results: CMTU27 and CMA07 cell lines expressed Gal-3 at similar levels, but CMM115 and CMM26 although expressing similar levels between them revealed to have a higher. All studied CTM showed Gal3 expression but expression decreased from benign to malignant tumours. In mice derived tumours, Gal-3 was detected in the less than 5% of the cells in necrose adjacent areas. In the metastasis Gal-3 was detected only inside small vessels.

Conclusions: Although all studied cell lines expressed Gal3 different levels of expression were found and was also different for CMTU27 when analysing the cells in in vitro and in vivo settings. It had been previously described in human cell lines the disappearance of Gal-3 expression when inoculated into nude mice. In CMT a downregulation of Gal-3 seems to be related with tumour aggressiveness. This is in accordance with the literature. Our findings indicate, for the first time in CMT, that Gal-3 may have the same biological behaviour as in human breast cancer and can thus constitute a promising target in CMT immunotherapy.

Imunoexpressão da Caveolina-1 em tecidos mamários caninos

Amorim, I., Lopes, C.C., Gil da Costa, R.M., Faustino, A.M.R., Dias Pereira, P.
Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

As caveolinas são proteínas integrais de membrana localizadas nas caveolae que parecem estar envolvidas em vários processos fisiológicos, nomeadamente a regulação das cascatas de transdução de sinal. Vários estudos têm documentado a subexpressão da Cav-1 (um dos membros da família das caveolinas) em diversos tipos de neoplasias, incluindo a mama, sugerindo que esta pode desempenhar um papel supressor tumoral. Algumas investigações recentes têm apresentado resultados contrários, relatando a sobreexpressão desta moléculas nas neoplasias da mama. Apesar destes resultados controversos, é consensual que a caveolina medeia o processo de vigilância tumoral constituindo, provavelmente, um factor importante na oncogénese. O papel das caveolinas no desenvolvimento dos tumores mamários caninos ainda não é conhecido e até à data, não existem trabalhos que avaliem a sua imunoexpressão no tecido mamário canino normal ou neoplásico. Assim, o objectivo deste estudo é avaliar a imunoexpressão da Cav-1 no tecido mamário canino normal e neoplásico, nos êmbolos neoplásicos e lesões metastáticas. Para tal, foram seleccionadas 5 amostras mama normal, 68 neoplasias (23 benignas e 45 malignas), 10 lesões metastáticas e 10 casos com êmbolos neoplásicos. Foram obtidos, a partir de cada caso, cortes consecutivos utilizados para coloração convencional com hematoxilina-eosina (HE) e para o estudo imunohistoquímico com o anticorpo policlonal anti-1 (Cav-1), BD Transdução Labs, diluído a 1:400. A imunoexpressão da Cav-1 foi avaliada de acordo com o grau, intensidade e padrão da marcação.

Em 60% das amostras mamárias normais e em 70% dos tumores benignos não foi encontrada qualquer imunorreatividade na população epitelial luminal, enquanto as restantes amostras apresentaram fraca marcação focal. Em 88% dos tumores malignos, 90% das lesões metastáticas e 90% dos êmbolos neoplásicos, foi observada marcação forte na maioria das células epiteliais luminais. Quase todas as células mioepiteliais exibiram imunorreatividade moderada a forte no tecido normal, bem como nos tumores benignos e malignos. A população neoplásica mesenquimatosa (áreas de diferenciação condróide e óssea) apresentou imunomarcação forte na grande maioria das células existentes. Os nossos resultados, que estão em conformidade com os dos mais recentes em estudos respeitantes a lesões mamárias na mulher, apoiam a hipótese de que a Cav-1 pode desempenhar um papel importante no processo de transformação. A Cav-1 é uma proteína integral de membrana que parece desempenhar uma função muito complexa que precisa de ser avaliada no contexto do ambiente neoplásico e co-relacionada com outras moléculas sinalizadoras, bem como com o estágio de progressão tumoral.

Outras investigações seriam bastante úteis com o intuito de identificar outras proteínas de sinalização e determinados factores que podem interagir com a caveolina, no sentido de promover a progressão tumoral.

[Immunoexpression of Caveolin-1 in canine mammary tissues]

Caveolins are integral membrane proteins of caveolae (from the Latin “little caves”) which seem to be involved in several physiological processes, including regulation of signal transduction cascades. Recent investigations have implicated caveolins in a variety of human diseases, namely breast cancer. Several studies documented a down-regulation of caveolin-1 (one of the members of the caveolin family) in breast cancer, suggesting that it may play a tumour-suppressive role, while others reported caveolin-1 overexpression in mammary neoplasms. Despite those contradictory results, it is consensual that caveolin mediate the tumour surveillance process, probably constituting an important factor when considering cancer research. The role of caveolins in the development of canine mammary tumour is still unknown and, so far, there are no reports on its immunoexpression in canine normal or neoplastic mammary gland. Samples of 5 normal canine mammary tissue, 23 benign and 45 malignant mammary neoplasms, 10 metastatic lesions and 10 cases with neoplastic emboli were collected. Consecutive sections were obtained from each case and used for haematoxylin-eosin (HE) staining and for the immunohistochemical study with polyclonal antibody caveolin-1 (Cav-1), BD Transduction Labs, diluted 1:400. The immunoexpression of Cav-1 was evaluated according to the grade, intensity and pattern of staining. In 60% of normal mammary samples and in 70% of benign neoplasms no immunoreactivity was found in luminal epithelial population; the remaining samples exhibited a focal weak negligible immunostaining. In 88% of malignant tumours, 90% of metastatic lesions and 90% of neoplastic emboli, a stronger and more extensive immunostaining was observed in luminal epithelial cells.

Almost all the myoepithelial cells exhibited moderate to strong immunoreactivity in normal tissues as well as in benign and malignant neoplasms. Neoplastic mesenchymal population presented strong cytoplasmic immunostaining in a large majority of cells. Our results, which are in accordance with previous studies in breast cancer, support the hypothesis that caveolin-1 may play an important role in the neoplastic transformation process, especially concerning the acquisition of a malignant and metastatic phenotype. However, others investigations presented contradictory results, which gives rise to some controversy regarding the role of Cav-1 in the oncogenic process. Through the caveolin scaffolding domain (CSD), which provides a platform for integrating signal transduction cascades, Cav-1 may be able to function as both negative or positive regulator of cell transformation.

Cav-1 seems to be an integral membrane protein that plays a very complex function that needs to be context-evaluated and co-related with other signaling molecules and the stage of tumor progression.

Further research would be very helpful in order to identify signaling molecules and modifying factors that interact with caveolins promoting tumourigenesis.

Registo oncológico em Medicina Veterinária: sim ou não?

Pires, M.A. e Travassos, F.S.

CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real

Os registos oncológicos ou de cancro são sistemas de informação sobre os novos casos de cancro que surgem numa determinada população e área geográfica num dado período de tempo.

Em Medicina Humana existe esse registo de forma sistemática e continuada e, a partir de 1991 como resultado da cooperação entre a “International Agency for Research on Cancer” e a “International Agency of Cancer Registries”, surgiu o livro “Cancer Registration, Principles and Methods” tornando esse registo uniforme na Europa.

No entanto essa realidade em Portugal tem vindo a ser cumprida de forma deficitária, mesmo sendo o registo do cancro sido dividido em três Registos Oncológicos Regionais (ROR).

Em Portugal o registo em Medicina Veterinária este registo não existe. Registos individuais e de epidemiologia ou simplesmente de registo de frequência tem vindo a ser feitos nos diferentes laboratórios de forma esporádica. Na Europa há um registo feito desde 1985 em Itália, e alguns registos nos EUA.

Teremos necessidade, ou deveremos fazê-lo também em Portugal, de forma continuada? Poderemos nós, patologistas Veterinários tirar as devidas ilações desse registo quando nos faltam muitos dos dados clínicos que são fundamentais para a devida interpretação deste registo? Como conseguiremos pôr acção esta difícil tarefa? Em que bibliografia nos poderemos basear para iniciar este registo? Será que o nosso registo individual por laboratório cumpre uma classificação que nos permite tornar este registo útil para todos? O registo em Medicina Veterinária engloba várias espécies. De que forma se devem abordar? Deveremos começar por alguma em especial?

De forma a ilustrar um início de um registo oncológico, apresentam-se os dados relativamente aos canídeos, do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD.

[Cancer registry in veterinary medicine. Yes or no?]

The tumour registry is a recorded information about the status of patients with tumours in a country in a determined period of time. A tumour registry is organised so the data can be analyzed.

The systemic registry of human tumour was made in Portugal and in the Europe based in the “Cancer Registration, Principles and Methods”, a book resulted of the cooperation of the “International Agency for Research on Cancer” and the “International Agency of Cancer Registries”.

In Portugal the tumour registry of animal’s don’t exist. Sporadic registrations of the frequency of animal tumours were made individually. In Europe there are one registry in Italy, and some in EUA.

In Portugal do we need to make a animal tumour registry? Could we, veterinary pathologist, made the correct interpretation when some important clinical data were missing? How can we do this work? What bibliographic bases could we use? Could be our individual laboratory registration a base of departure of this task? The veterinary registry needs to have different registries for multiple species. Can we do the registry fort all species together or one by one?

We will present the tumour registry in dogs based on the data of the Laboratory of Histology and Anatomic Pathology UTAD.

Caracterização neuropatológica do envelhecimento nos canídeos

Lima, C.¹, Matos, E.², Gartnër, F.³, Melo Pires, M.⁴

¹ INRB IP, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

² Departamento de Saúde Comunitária, Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

³ Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto; IPATIMUP, Universidade do Porto

⁴ Centro Hospitalar do Porto, Hospital de Santo António; Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

Os avanços da medicina e da alimentação proporcionaram um aumento da esperança de vida dos animais de companhia em geral e especificamente do cão. As alterações neuropatológicas associadas ao envelhecimento estão descritas em várias espécies animais, incluindo o cão idoso que desenvolve défices cognitivos e alterações neuropatológicas semelhantes às observadas no envelhecimento normal dos humanos e na doença de Alzheimer, constituindo um bom modelo de estudo das fases iniciais desta patologia. Este trabalho pretende contribuir para a caracterização das alterações neurodegenerativas do Sistema Nervoso do cão associadas ao envelhecimento e verificar as suas semelhanças com o envelhecimento humano e a doença de Alzheimer.

Foram estudados 70 cérebros de cães de várias raças, com idades compreendidas entre os 1 e 18 anos. O estudo neuropatológico envolveu o exame macroscópico e histopatológico através de coloração de rotina Hematoxilina & Eosina. Foi realizada imunohistoquímica, ao nível do lobo frontal e temporal, para detecção de proteína β -amilóide (6F/3D, Dako, MO872), ubiquitina (Dako, ZO458), proteína glial fibrilar ácida (GFAP, Dako, ZO334) e proteína *tau* (Dako, A0024). Foram efectuados estudos ultraestruturais em quatro cães idosos.

Os resultados foram sujeitos a análise comparativa com a espécie humana tendo em conta o escalão etário (1-7anos, n=16; 8-12anos, n=24; ≥ 13 anos, n=30), a idade do cão correspondente à do homem em função do peso (<65 e ≥ 65 anos) e de acordo com o porte (pequeno, médio, grande e gigante).

As principais alterações neuropatológicas associadas ao envelhecimento foram: a fibrose das meninges ($p < 0.001$), a dilatação dos ventrículos laterais ($p = 0.03$), a hialinização vascular ($p < 0.001$), a astrocitose do córtex ($p = 0.045$), a acumulação de lipofuscina ($p < 0.001$), o aumento do número de inclusões e corpos ubiquitinados ($p < 0.001$), a deposição vascular de proteína β -amilóide ($p < 0.001$) e a formação de placas de amilóide ($p < 0.001$). O estudo ultraestrutural identificou tranças neurofibrilares no córtex temporal de um Caniche com 12 anos. A deposição de proteína β -amilóide vascular e sob a forma de placas verificou-se apenas nos cães com mais de 8 anos, de forma mais consistente ao nível do córtex frontal. Ao contrário do que se observa no homem, no cão a angiopatia amilóide não apareceu associada a hemorragias intracerebrais. Apesar da maioria dos estudos neuropatológicos referirem que o cão não desenvolve tranças neurofibrilares, o estudo ultraestrutural identificou tranças neurofibrilares no córtex temporal. Os resultados obtidos demonstram que o cão e o homem partilham muitas das alterações neuropatológicas verificadas no envelhecimento, o que reforça a teoria de que os cães idosos são um bom modelo de estudo da doença de Alzheimer e envelhecimento do humano.

[Neuropathology of ageing dogs]

Advances in medicine and food diet have provided an increase of dog's life span. The neuropathological changes associated with ageing are described in various animal species, including the elderly dog which develops cognitive deficits and neuropathological changes similar to those seen in human ageing and in patients suffering from Alzheimer disease, making these a good model to study the early stages of this condition. The aim of this study was to describe aged related neuropathology findings in old dogs, and compare these findings with the human changes, to corroborate the usefulness of the dog as a natural animal model for the study of normal ageing and Alzheimer disease.

In this study, brain tissue of 70 dogs of different breeds, aged between 1 to 18 years old, were analyzed. The neuropathological study involved macroscopic examination and routine Hematoxinil and Eosin staining tissues. Immunohistochemical detection of β -amyloid protein (6F/3D, Dako, MO872), ubiquitin (Dako, ZO458), astrocytic reactivity to glial fibrillary acid protein (GFAP, Dako, ZO334) and immunoreactivity to *tau* protein (Dako, A0024), was performed in frontal and temporal lobe. Ultrastructural study was performed in 4 old dogs. Results were subjected to comparative analysis in accordance with the age group (1-7 years, n=16; 8-12 years, n=24; ≥ 13 years old, n=30), in accordance with dog's age relating to man's, depending on dog's weight (<65 and ≥ 65 years) and size (small, medium and large). The main neuropathological age related-changes findings were: meningeal fibrosis ($p < 0.001$), ventricular enlargement ($p = 0.03$), vascular hyalinization ($p < 0.001$), cortical astrocytosis ($p = 0.045$), lipofuscin storage ($p < 0.001$), increased number of inclusions and ubiquitinated bodies ($p < 0.001$), vascular deposition of β -amyloid protein ($p < 0.001$) and amyloid plaques ($p < 0.001$). The ultrastructural study identified neurofibrillary tangles in the temporal cortex of a Poodle with 12 years old. Our studies indicate that, only the aged dogs, with more than 8 years old, showed vascular amyloid angiopathy and senile plaques, the earliest and most consistent site of A β deposition was in the pre-frontal cortex. Unlike humans, the present of amyloid angiopathy in dogs was not correlated with intracerebral hemorrhage. Although the majority of neuropathological studies in CNS ageing dog's do not describe neurofibrillary tangles in neurons, the ultrastructural study identified neurofibrillary tangles in the temporal cortex. These results show that aged dog shares many important features of brain ageing in humans, confirming the dogs provide a good model for the study of either normal ageing or Alzheimer disease.

Um caso de dermatite nodular por *Straelensia cynotis*

Saraiya, A.L.¹, Leão, C.², Louro, M.F.², Ribeiro, S.P.², Travassos, F.³, Pires, M.A.³

1 Gram - Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária

2 Centro Clínico Animal, Guimarães

3 CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real

A dermatite nodular induzida por *Straelensia cynotis* é uma doença pouco comum no cão, mas vários casos têm vindo a ser descritos desde 1999. Afecta preferencialmente cães que vivem em áreas rurais, em condições climáticas específicas. As lesões macroscópicas da doença consistem numa dermatite nodular, que afecta principalmente as regiões dorsais do corpo; o prurido não é um sintoma consistente. A biópsia de pele é diagnóstica, uma vez que existem duas características histológicas típicas da doença: hiperplasia folicular pseudoepiteliomatosa e mucinose perifolicular. No presente trabalho, descrevemos um caso de stralensiose num cão da região norte de Portugal, considerando ser importante a divulgação desta patologia. Acreditamos também, que esta parasitose deve ser incluída nos diagnósticos diferenciais das dermatites nodulares em canídeos.

[Nodular dermatitis induced by *Straelensia cynotis* in a dog]

Nodular dermatitis induced by *Straelensia cynotis* in dogs is an uncommon skin disease, but several cases started to be reported since 1999. It affects specially dogs that live in rural areas, in specific climatic conditions. The macroscopic lesions of the disease primarily consist in a typical nodular dermatitis, affecting mainly the dorsal regions of the body, in which pruritus is not a consensual characteristic. Skin biopsies are diagnostic, because there are two characteristic histological features: pseudoepitheliomatous follicular hyperplasia and perifollicular mucinosis. We report a case of straelensiosis in a dog in north of Portugal, and we consider to be very important the divulgation of this pathology. We believe that this parasitosis should be included in the differential diagnosis of nodular dermatitis in dogs.

Lymphoma classification in animals. The vision of a Pathologist in Human medicine

Cabeçadas, José

Serviço de Anatomia Patológica, IPOLFG, Lisboa

The understanding of the neoplastic pathology of the immune system as an alteration of the mechanisms of normal differentiation and maturation, associated to the similarity of the immune system in most mammals, prompted the use of the human model in the diagnosis and classification of lymphomas in other animals. If the theoretical model seems easy, the practice comes across with difficulties at diverse levels: the relative scarcity of bibliographical information on the subject is a factor that cannot be neglected; the fact that this area of histopathology depends, in part, on a necessity of phenotyping renders it particularly vulnerable due to the absence of specific reagents for other animal species and to the lack of knowledge of the normal reactivity in other animals of the antibodies used in human pathology; the weight of the autopsy series in veterinary medicine literature hampers the clinical correlation. From a practical point of view and concerning the morphological patterns, the very variable cellular kinetics from species to species will have to be taken into consideration, as well as the higher prevalence of the association with infectious agents, especially viral, within the animal neoplasms, resulting in different percentages of lymphomas with aggressive morphology.

The difficulty of using anti-human antibodies could be relieved by the increasing availability of antibodies that have transcription factors as targets, circumventing the higher variability of membrane antigens, in the different species. The joint experience of the services of Anatomia Patológica of the IPO Lisbon and the FMV of Lisbon demonstrates that with the aid of a limited panel of antibodies it is possible to diagnose and classify animal lymphomas. This contribution is useful for both the specialties, with human medicine taking advantage in the identification of animal models, and veterinary medicine of the larger development of the human pathology in this area.

Experiência no diagnóstico e tratamento de linfoma em cães e gatos

Montenegro, L.

Hospital Veterinário Montenegro, Porto

Em cães o linfoma é um dos tumores malignos mais comuns. Existem várias formas de apresentação que são geralmente classificadas como linfoma alimentar /digestivo, linfoma mediastínico, linfoma extranodal / atípico (cutâneo, renal, SNC, ocular) e multicêntrico.

Esta última forma é a mais comum e a maioria dos pacientes são assintomáticos no momento do diagnóstico. A citologia do linfonodo é fácil de realizar, pouco invasiva e usualmente suficiente para chegar a diagnóstico. Desde há longos anos este tumor tem sido tratado de forma bem sucedida com o uso de quimioterapia. Na actualidade existem alguns protocolos multi-agente que podem incorporar agentes como lomustine, cyclophosphamida, vincristine, L-asparagynase, prednisolona e doxorubicine. Com estas combinações nós constatamos uma grande proporção de sobrevivência a longo prazo (2 anos ou mais). A selecção do protocolo quimioterápico depende do sub-estadio (doente ou saudável), do imunofenotipo (células B ou T), da presença de hipercalemia, resposta a terapia, e provavelmente e talvez a mais importante a colaboração e compreensão dos proprietários.

O linfoma é também uma importante causa de doença na espécie felina. A forma mais comum é a gastrointestinal (gatos velhos 10 - 12 anos, usualmente FELV negativos, células B). Os outros tipos são os mediastínicos em (gatos jovens 2 - 3 anos, FELV positivos e células T), forma multicêntrica (FELV positivo ou negativo, células T) e a forma extranodal (renal bilateral, ocular, CNS, nasal e pele). No passado o linfoma predominate era o mediastínico em gatos jovens FELV positivos, actualmente a forma gastro-intestinal em gatos velhos FELV negativos é a mais comum.

A decisão do tratamento depende do estadio do FELV sub-estadio da doença e resposta terapêutica. Em gatos, factores como local anatómico da doença, idade, estadio FIV, pré-tratamento com prednisolona, imunofenotípicos (células T versus células B), não parecem afectar o prognóstico.

Na nossa experiência podemos dizer que a doença é facilmente diagnosticada, mas a escolha do melhor protocolo para cada caso não é fácil. Na maioria dos casos nós temos bons resultados e satisfação dos clientes. No futuro esperamos ter uma maior interação com os laboratórios de anatomia patológica e uma informação mais detalhada de forma a melhorar o nosso trabalho no que concerne ao estabelecimento do prognóstico, escolha de protocolos e monitorização terapêutica.

[Experience in diagnosis and treatment of lymphoma in dogs and cats]

In dogs lymphoma is one of the most common malignant tumours. There are many different presentations that are generally classified as alimentary/digestive lymphoma, mediastinal lymphoma, extranodal/atypical lymphoma (cutaneous, renal, CNS, ocular) and multicentric. This last form is the most common and the majority of the patients are asymptomatic at the moment of the diagnosis. A lymphnode citology is easy to perform, minimally invasive and usually enough to get to the diagnosis.

Over the years this tumour has been treated successfully with the use of chemotherapy. At the moment there are many effective multi-agent protocols that can incorporate agents like lomustine, cyclophosphamide, vincristine, L-asparagynase, prednisolone and doxorubicine. With these combinations we see a larger proportion of long term survivors (two years or longer). The selection of the chemotherapy protocol depends of the substage (sick or healthy), the immunophenotype (B or T-cell), the presence of hypercalcemia, response to therapy, and probably the most important the cooperation and understanding of the clients.

Lymphoma is also an important cause of illness in the feline species. The most common form is gastrointestinal lymphoma (older cats 10-12 years, usually FeLV negative, B-cell). The other types are the mediastinal (young cats 2-3 years, FeLV positive, T-cell), the multicentric form (FeLV positive or negative, T-cell) and the extranodal form (renal bilateral, ocular, CNS, nasal and skin). On the past the predominant lymphoma was the mediastinal in young cats FeLV positive but at the moment the gastrointestinal form in old cats, FeLV negative is more common.

The decision of treatment depends of FeLV status, substage of disease and response to therapy. In cats, factors as anatomic site of the disease, age, FIV status, pretreatment with prednisolone, immunophenotype (T-cell vs B-cell) don't appear to affect the prognosis.

In our experience we can tell that the disease is easy to diagnose but choosing wich protocol is best to each individual animal is not so easy. In the majority of the cases we have good results and very satisfied clients.

In the future we expect to have more strict relations with the anatomopathology laboratory and also more detailed information to improve our work on the prognosis, choice of protocol and monitorization of treatments.

Avicultura

Comunicação por convite

Patologias mais frequentes em galinhas poedeiras

Grosso, Tiago Manuel Branco

Rações Zêzere S.A.

O objectivo principal desta apresentação, visa uma revisão geral às doenças infecciosas e metabólicas mais relevantes do sector da produção de ovos, tendo em conta os aspectos principais: preocupação com a segurança alimentar e as eventuais perdas económicas causadas por processos patológicos.

As crescentes exigências por parte do consumidor, levaram a Indústria Avícola a produzir o ovo de consumo como um produto de qualidade, sem resíduos, sem risco de causar toxinfecção alimentar e com uma garantia de total rastreabilidade.

Por outro lado, houve por parte das empresas de selecção genética de poedeiras, uma tendência para aumentar substancialmente o rendimento produtivo das aves, fundamentalmente por aumento do nº de ovos por galinha alojada, qualidade do ovo (principalmente a nível da casca) e eficiência alimentar (redução do índice de conversão). Estes progressos genéticos, levaram a um aumento da susceptibilidade dos animais a determinadas patologias e a adaptação às técnicas de manejo e alimentação para que sejam atingidos os objectivos produtivos.

As principais dificuldades e desafios em manter o estatuto sanitário elevado são as seguintes:

Biossegurança – Problemática dos núcleos multi-idade (manejo tudo dentro - tudo fora);

Alimentação – Adequação permanente do alimentos às necessidades cada vez mais exigentes da galinha poedeira;

Manejo/Ambiente – Importante para manter uma elevada resposta imunitária dos animais;

Genética – Aumento do rendimento produtivo leva a uma susceptibilidade acrescida;

Correcto Programa profilático – Importante para manter o estatuto sanitário elevado;

Regulamentações e limitações legislativas – Uso limitado de antibióticos (L.M.R.'s).

1- Doenças mais importantes na fase de recria:

. Onfalites – Geralmente associado a problemas de incubação e stress nos primeiros dias;

. Doença de Gumboro – Responsável por mortalidades elevadas entre as 3 e 5 semanas de vida, nos casos mais graves pode chegar aos 70%;

. Micoplasmoses (Doença respiratória crónica) – Agente imunossupressor; Importante o estatuto indemne por parte do fornecedor de pintas do dia (cortar transmissão vertical).

2- Doenças mais importantes na fase de produção:

. *Salmonella* – Principal problema da segurança alimentar na actualidade. Está em vigor um Plano Nacional de Vigilância e Controlo;

. Laringotraqueíte infecciosa – Possibilidade de recirculação de vírus vacinal;

. Bronquite infecciosa – Responsável por graves perdas produtivas; grande capacidade de recombinação vírica; aparecimento de vírus variantes;

. Pneumovirus (Síndrome de cabeças inchadas, TRT) – Perdas produtivas elevadas; vírus imunossupressor: aumento de susceptibilidade a agentes bacterianos secundários;

. Doença de Newcastle – Actualmente controlada por programas vacina adequados;

. Doença de Marek – Actualmente pouco expressiva; programas vacinais adequados;

. Influenza Aviária – Em caso de surto da doença, necessidade de rápida informação epidemiológica e medidas de contenção;

. Ovarite colibacilar – Doença bacteriana mais comum em produção; geralmente secundária a agentes imunossupressores;

. Micoplasma – Agente imunossupressor muito importante; prevalência elevada principalmente em núcleos multi-idade;

. *Pasteurella* – Doença bacteriana secundária;

. Piolho Vermelho (*Dermanyssus gallinae*) – Doença parasitária em grande expansão, responsável por graves perdas económicas actualmente;

. ORT – Doença bacteriana em expansão, responsável por aumento de mortalidade e quebras de produção.

Frangos de carne: as histórias que eles nos contam

Sousa Nunes, José João R.

Médico Veterinário

A abordagem de um problema clínico em avicultura de carne tem as suas singularidades.

Os frangos de carne, como as aves em geral, exteriorizam os seus sinais de doença de um modo menos expressivo do que os mamíferos. Por outro lado, os sintomas que podemos observar são praticamente sempre os mesmos (ou têm muito em comum), independentemente da situação clínica em causa.

Para ultrapassar estas dificuldades, o veterinário avícola tem de estar atento a tudo o que envolve os animais, fazer uma análise rigorosa a todos os procedimentos de maneio postos em prática e só depois partir para o acto clínico em si.

Nesta apresentação discute-se a importância do “diálogo” que o veterinário deve ter com os animais e tudo o que os envolve e faz-se um pequeno “check list” desses pontos, chamando a atenção para o que há de mais importante a reter.

Como nota final fica a necessidade do máximo de coerência e bom senso na sistematização e compreensão de todos os dados colhidos, já que tratar de aves é muito mais do que um acto clínico isolado.

[Broilers: the stories they tell us]

The way we approach a clinical situation in poultry clinics is very particular.

The broilers, as well as all the poultry species, show their symptoms in a less expressive way, compared to mammals. On the other hand, symptoms are the same (or very similar), even when completely different pathologies are concerned.

To overcome these difficulties, the avian vet must pay attention to everything related to the animals, as well as analyse in detail all management procedures. Only after that, the vet may be in conditions to continue with the clinical examination itself.

In this presentation, the “dialogue” between the vet, the animals and everything around them is discussed, and a check list of all these aspects is proposed.

As a conclusion, we realise that a good systematization of all data, as well as a vast experience and common sense are needed. Therefore, “poultry clinics” is much more than a simple clinical examination.

Ovinotecnia e Caprinotecnia

Comunicação por convite

Influência do factor clima nos cenários epidemiológicos de doenças infecciosas nas populações de pequenos ruminantes em Portugal Continental

Almeida, Virgílio

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

O que é que a brucelose dos pequenos ruminantes, o tremor epizoótico atípico dos ovinos e dos caprinos ou scrapie atípico e a língua azul têm em comum?

Recorrendo a estas três doenças infecciosas, presentes nas populações de pequenos ruminantes de Portugal continental, o Autor destaca o efeito do meio ambiente, e em particular do clima, nas interações da tríade hospedeiro-agente-ambiente que condicionam a ocorrência destas doenças.

São enfatizadas as dificuldades que estas interações colocam no controlo e na erradicação destas doenças, num contexto em que o factor clima é um "marcador de risco" pois não pode ser manipulado pelo Homem.

Significa isso, por exemplo, que teremos que aprender a viver com doenças transmitidas por insectos vectores no futuro? O aquecimento global, a globalização, a ausência de ferramentas como vacinas ou fármacos para lutar contra estes agentes parece conduzir-nos nessa direcção. Assistiremos, então, a uma inversão nas políticas da União Europeia que têm primado pela acreditação sanitária das explorações premiando elevados níveis de biossegurança que culminam na atribuição de estatutos "livres" relativamente a um número crescente de doenças infecciosas? Estará a fileira dos pequenos ruminantes organizada, treinada e consciente destes novos desafios que poderão condicionar a sua competitividade?

Tentaremos responder a estas questões, e sempre que for conveniente, reforçaremos ideias recorrendo a exemplos de outras doenças infecciosas.

[Climate influences upon the epidemiological scenarios of infectious diseases on small ruminants flocks in Portugal Continental]

What have in common brucellosis, atypical scrapie and bluetongue?

Making use of these three infectious diseases present in Portuguese small ruminants flocks, the Author points out the effect of the environment, namely the climate, on the interplays of the triad host-agent-environment that regulate disease occurrence.

The difficulties placed by these interplays on disease control and disease eradication are highlighted on a context where climate is a risk indicator because we cannot change it.

Does this mean that, for instance, we have to learn to live in the future with insect-borne diseases? Global warming, globalization, the absence of tools such as vaccines or drugs to cope with these agents seems to led us on that road. May we wait a reversal on the European Union animal health policies that have been built based on eradication programmes and health status accreditation rewarding very high levels of farm biosecurity? Is the small ruminants chain organized, trained and aware of these challenges that may confine its competitiveness?

We will adress these questions, using whenever necessary examples of other infectious diseases.

Influência das alterações climáticas nos quadros epidemiológicos regionais das parasitoses dos pequenos ruminantes

Pereira da Fonseca, Isabel M., Madeira de Carvalho, Luis M.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; ifonseca@fmv.utl.pt, madeiradecarvalho@fmv.utl.pt

As alterações climáticas ocorridas ao longo dos últimos 30 anos têm determinado várias consequências a nível ambiental, em particular nas zonas temperadas, as quais apresentam cada vez mais características tropicais ou subtropicais. O aumento das temperaturas médias ou das suas flutuações, pode induzir a breve trecho alguns cenários de grande importância nas parasitoses dos pequenos ruminantes, em particular porque os invernos se tornam mais amenos e os verões mais quentes ou com flutuações, sendo por vezes mais frios e húmidos como no biénio 2007-2008.

Em primeiro lugar, os parasitas que se desenvolvem a partir de estádios de vida livre na pastagem, apresentam maior número de gerações, com ciclos biológicos de menor duração. A manutenção das temperaturas e humidades óptimas por períodos mais longos permitem também que os estádios infectantes sobrevivam até mais tarde, infectando os hospedeiros no Inverno, inclusive em latitudes mais a norte. Por outro lado, como as épocas frias são mais atenuadas, não ocorre redução das populações de formas infectantes no ambiente e verifica-se um menor período de desenvolvimento retardado nas formas em hipobiose (nematódes) ou em diapausa (insectos). Finalmente, há maior probabilidade de os hospedeiros se reproduzirem com maior frequência (os 2 partos/ano serão mais comuns) e o clima ameno conjugado com uma maior utilização de pastagens de regadio, serão factores favoráveis ao aparecimento de maior número de borregos e cabritos facilmente susceptíveis às parasitoses na população global de hospedeiros. De entre as parasitoses que podem ser exacerbadas ou readquirir importância, por vezes negligenciada, contam-se algumas helmintoses (estrongilidose gastrointestinal, monieziose e fasciolose), várias protozooses (coccidioses intestinais por *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp., babesioses e teilerioses) e ectoparasitoses (míases primárias e secundárias, sarnas e ixodidoses).

Como conclusão é importante referir que, em presença de alterações climáticas, além de uma maior disponibilidade de formas parasitárias no ambiente, verifica-se uma maior susceptibilidade dos hospedeiros. Pelo exposto recomenda-se uma abordagem mais atenta das parasitoses, passando por um maior estudo/monitorização das mais prevalentes em determinadas zonas do País, tendo em vista uma actualização dos seus perfis epidemiológicos e de patogenia. O planeamento de sistemas de controlo parasitário estratégico mais adequados aos novos padrões climáticos, aos novos tipos de exploração animal (pastagens de regadio e sistemas de produção biológica) e à maior susceptibilidade dos ovinos e caprinos aos agentes parasitários, associada à existência/disseminação de resistências aos anti-parasitários, devem constituir uma prioridade para conseguir melhores níveis de produção em pequenos ruminantes no nosso País.

[Influence of climatic change in the regional epidemiological features of small ruminant parasitic diseases]

Climate changes occurring over the past 30 years have originated environmental consequences, particularly in temperate zones, which have developed tropical or subtropical characteristics. The increase in average temperatures or its fluctuations, may induce in a near future an exacerbation of parasitic diseases of great importance in small ruminants, especially because the winters become milder and the summers hotter or with fluctuations, being cooler and moist, like in the 2007-2008 biennium.

First of all, the parasites that develop from free living stages in the pasture reveal an increase in the number of generations, with shorter biological cycles. The maintenance of optimal temperature and moisture for longer periods also enables the infective stages to survive longer, infecting the host in winter, even in northern latitudes. Furthermore, as the cold season is milder, there isn't a marked reduction of populations in the environment, associated with a shorter period of delayed development of forms in hypobiosis (nematodes) or in diapauses (insects). Finally, hosts reproduction will be more frequent (2 births per year will be more common) and mild climate combined with greater use of grazing on irrigated land, will be favorable factors to the emergence of a greater number of lambs and kids easily susceptible to parasitic diseases. Among the parasitic diseases that may be exacerbated or regain importance, it is important to refer some helminthosis (gastrointestinal strongyloidosis, monieziosis and fasciolosis), several protozoosis (intestinal coccidiosis by *Eimeria* spp. and *Cryptosporidium* spp., babesiosis and teileriosis) and ectoparasitosis (primary and secondary myiasis, scabies and ixodidosis).

In conclusion, in the presence of climate changes, there is an increased availability of parasitic forms on the environment and a greater susceptibility of the hosts. Therefore it is recommended to study and to monitor the most prevalent parasitic diseases in certain areas of the country in order to update their epidemiological and pathogenic profiles. The design of adequate parasitic control systems according to new climate changes patterns, new animal production systems (irrigated pastures and organic farming systems) and increased susceptibility of sheep and goats to parasitic agents, associated with the evaluation of possible existence/widespread anti-parasitic resistance, is a priority to achieve better standards of small ruminant production in our country.

Parasitoses de pequenos ruminantes na região da Cova da Beira

Lagares, A.F., Melo, R., Catarino, A.L.

Vetcoo Serviços Veterinários, Lda

O parasitismo constitui o principal responsável por perdas económicas em explorações de ovinos e caprinos, devido a consequências directas (mortalidade do hospedeiro, perdas de produção) ou indirectas (custos de tratamento, controlo e manejo). Com o objectivo de avaliar a intensidade do parasitismo e o risco de infecção, na região da Cova da Beira, onde a maioria do efectivo é composto por pequenos ruminantes, fizeram-se colheitas e análises, de fezes, palha da cama e erva da pastagem, entre Outubro de 2007 e Maio de 2008. A incidência de hemoparasitas nos animais da região era também desconhecida pelo que, foi de todo o interesse averiguar a sua presença ou ausência, através da realização de esfregaços sanguíneos. Foram recolhidos, igualmente, ectoparasitas, principalmente ixodídeos, com o objectivo de conhecer os géneros mais abundantes na zona, e feitas raspagens de pele para pesquisa de ácaros.

As amostras de fezes recolhidas, foram enviadas para o Laboratório de Diagnóstico Veterinário de Alcains, e as porções de palha da cama e erva da pastagem, colhidas com a finalidade de conhecer o nível de contaminação, foram posteriormente processadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da UTL.

Detectou-se infecção por ovos de strongilídeos gastrointestinais (EGI) e oocistos de *Eimeria* nos animais da maioria das explorações. Pela amostra observada pensa-se que os géneros *Anaplasma* e *Theileria* possam ser endémicos na região. Foram detectadas formas de *Anaplasma* nos animais de todas as explorações, e formas de *Theileria* na sua maioria. O género *Babesia* não foi encontrado nas amostras observadas, não se podendo excluir a sua presença. Os ixodídeos obtiveram pouca representatividade neste estudo, principalmente por ter sido realizado num curto período de tempo. No entanto, encontraram-se dois géneros importantes, *Rhipicephalus*, o mais comum, e *Dermacentor*, ambos implicados na transmissão de hemoparasitas. As sarnas tiveram uma frequência muito baixa, também devido à época do ano, em que se realizou o trabalho. Os métodos de manejo, nomeadamente a frequência da substituição da palha da cama e a rotação do pastoreio, mostraram ser de importância crucial no controlo de parasitoses.

Trabalho financiado por Esteve Farma Lda.

[Small ruminants' parasitosis in the region of Cova da Beira]

Parasitism constitutes the major cause for economic losses in sheep and goat exploitations, due to direct (host mortality, reduced productivity) and indirect consequences (treatment, control and management costs). Looking forward the evaluation of the parasitic intensity and of the infection risk, in the region of Cova da Beira, where the majority of the animal production is constituted by small ruminants, samples of faeces, bed straw and pasture grass were collected and analyzed, between October of 2007 and May of 2008. The incidence of haemoparasites was also unknown, so it seemed interesting to investigate its presence or absence in the region's animals, through the execution of blood smears. Ectoparasites were also collected, mainly ixodid tick specimens, for subsequent identification and to be aware of the most common genera in this region, and skin scrapings were made to search for mites. The faeces samples collected were later sent to Veterinary Diagnostic Laboratory of Alcains, and the portions of bed straw and pasture grass picked in order to determine the contamination level, where then processed at the Laboratory of Parasitic Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon.

An infection by gastrointestinal strongylid eggs and by oocysts of *Eimeria* was detected in the animals from most farms. It was observed that the genera *Anaplasma* e *Theileria* may have endemic character in sheep and goats in this region. *Anaplasma* shapes were detected in the totality of exploitations, and *Theileria* shapes in mostly. *Babesia* was not found in the observed samples, but we cannot exclude its presence. The ixodid ticks had little representation in this study. However, two important genera were found, *Rhipicephalus*, the most common, and *Dermacentor*, both involved in the transmission of haemoparasites. Scabies mites had also low frequency, due to the period of the year in question. The management methods, such as the substitution frequency of the bed straw and the pasture rotation proved to be of crucial importance when controlling parasites.

Project financed by Esteve Farma Lda.

Actualidades sobre Língua Azul

Boinas, Fernando

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A Língua Azul (LA) é uma doença dos ruminantes caracterizada por congestão edema e hemorragia. É causada por um arbovírus (VLA) que tem 24 serótipos que não garantem protecção cruzada entre si.

É uma doença infecciosa e não contagiosa já que os insectos culicídeos são indispensáveis para o ciclo de transmissão do VLA em todos os serótipos excepto o VLA8. As fêmeas de algumas espécies de culicídeos podem infectar-se quando fazem uma refeição de sangue em animais virémicos e transmitem o vírus quando se alimentam em ruminantes susceptíveis. Com o VLA8 pode também ocorrer a transmissão pelas vias oral e transplacentária em bovinos.

Todos os serótipos do VLA podem causar doença clínica em ovinos. Com a excepção do VLA8 que causa doença clínica em caprinos e bovinos, em todos os outros serótipos do VLA, os bovinos infectados têm doença sub-clínica e são considerados reservatórios temporários do vírus.

Classicamente, a Língua Azul foi considerada como uma doença que ocorria em zonas delimitadas pelos paralelos 35°S e 40°N mas, esta situação mudou dramaticamente desde Agosto de 2006 quando foi reportado o primeiro surto de VLA8 na Europa Central. A LA tem vindo a difundir-se por vastos territórios na Europa em latitudes superiores ao passado devida, principalmente, à difusão do serótipo 8 e, mais recentemente, do VLA1.

Em Portugal, a primeira epidemia de LA ocorreu em 1956 e foi erradicada em 1960 após uma campanha de vacinação dos ovinos na área afectada. Após 44 anos, em 2004, a doença foi novamente reportada em Portugal causada pelo VLA4 e, em 2007, foi também isolado um novo serótipo (BTV1).

Em Portugal as áreas endémicas para Língua Azul estão restritas a regiões onde existe o insecto vector *C.imicola* e a sazonalidade dos surtos de doença tem coincidido com o pico de actividade deste insecto. Noutras regiões da Europa têm sido identificadas outras espécies de culicídeos que têm competência vectorial para o VLA.

Não existe tratamento efectivo para o Língua Azul e as principais medidas de prevenção e de controlo são baseadas na:

- . Análise epidemiológica e estabelecimento de restrições à movimentação animal de acordo com a avaliação de risco.
- . O diagnóstico laboratorial é uma ferramenta essencial para determinar a ocorrência de infecção nos animais e os testes usualmente utilizados são: RT-PCR para detecção de RNA viral até 20 semanas pós-infecção, e cELISA que detecta anticorpos que são produzidos 7-14 dias após a infecção e que, normalmente, persistem pelo resto da vida.
- . Medidas de prevenção e controlo de vectores.
- . Campanhas de vacinação massiva para serótipos específicos do VLA.

[Actualities on Bluetongue]

Bluetongue is a disease of ruminants characterized by congestion, oedema and haemorrhage. It is caused by an arbovirus (BTV) that has 24 serotypes that do not promote cross-protection between them.

It is an infectious and non-contagious disease since *Culicoides* midges are necessary in the transmission cycle with all the serotypes, except BTV8. The females of some species of *Culicoides* can become infected when having a blood meal on viraemic animals and may transmit the virus when feed on susceptible ruminants. With a particular serotype, BTV 8, transplacental and oral transmission in cattle can also occur.

All BTV serotypes can cause clinical disease in sheep. Although cattle generally have sub-clinical disease and are considered long-term reservoirs of the virus, if BTV8 is implicated cattle and goats can be clinically affected.

Classically the disease was considered contained within the parallels 35°S and 40°N but, this situation changed dramatically since August 2006, when the first occurrence of BTV8 in Central Europe was reported. Bluetongue has been spreading in Europe throughout vast territories in more northern latitudes than in the past with relation mainly to BTV8 and, more recently, to BTV1.

In Portugal the first epidemic of Bluetongue happened in 1956 and was eradicated in 1960 after a vaccination campaign of ovine in the affected area. After 44 years, in 2004, the disease was again reported in Portugal caused by BTV4 and in 2007 a new serotype was isolated (BTV1).

The endemic areas in Portugal are restricted to the regions where the insect vector *C.imicola* prevails and the seasonality of the outbreaks has been coinciding with the peak activity of this midge. In other regions of Europe several species of *Culicoides* were evaluated and considered competent for the transmission of BTV.

There is no effective treatment to bluetongue and the main prevention and control measures are based in:

- . The epidemiological analysis and establishment of restrictions to animal movement according to the risk evaluation.
- . Laboratory diagnosis is an essential tool to evaluate the infection status and the tests usually performed are: RT-PCR to detect viral RNA up to 20 weeks post-infection, and cELISA to detect antibodies that are produced 7-14 days after infection and normally persist throughout life.
- . Vector prevention control measures.
- . Mass vaccination campaigns for specific BTV serotypes.

Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beira Baixa com base em tCCS

Barreira, A.C.R.¹, Águas, M.J.A.C.² e Almeida, V.³

1 Direcção de Serviços de Veterinária da Região Centro

2 D.R.A.P.C.

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Objectivos: Recorreu-se à tCCS para avaliar a qualidade do leite de ovelha na região da Beira Baixa.

Material e métodos: Quantificaram-se as tCCS em 685 amostras provenientes de 68 explorações localizadas na área geográfica do Queijo de Castelo Branco (DOP): concelhos do Fundão, Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Vila Velha de Ródão, Covilhã e Belmonte. As amostras foram recolhidas semanalmente, do tanque de mistura das explorações fornecedoras, por técnicos de cinco queijarias da área-alvo, de Janeiro a Maio de 2007: 50 ml de leite, acondicionados em frascos esterilizados e transportados em mala térmica a 0-4 °C ao laboratório.

As amostras foram processadas no Laboratório de Apoio Regional de Alcains da D.R.A.P.C. por citometria de disco num contador electrónico de células integralmente automático, FOSSOMATIC 250 (Foss® 250/360), no período de 24 horas após a sua colheita. Os resultados foram armazenados em Excel 2007 para posterior análise estatística no SPSS 15.0.

Resultados e discussão: A média de tCCS foi $0,551 \times 10^6$ células/ml e a mediana $0,467 \times 10^6$ células/ml (valor máximo: $5,762 \times 10^6$ células/ml; valor mínimo: $0,015 \times 10^6$ células/ml). Esta tCCS média é um bom indicador de acordo com o limiar em vigor nalguns países da UE como a França, a Itália e a Espanha (o máximo aceitável de tCCS varia de 0,5 a $1,0 \times 10^6$ células/ml) e nos E.U.A. (o máximo aceitável de tCCS são $1,0 \times 10^6$ células/ml).

12,6% das amostras processadas apresentaram tCCS $> 1,0 \times 10^6$ células/ml; 28,8% tCCS entre 0,5 e $1,0 \times 10^6$ células/ml e 58,7% tCCS $< 0,5 \times 10^6$ células/ml. A média mais elevada de tCCS registou-se em Vila Velha de Ródão: $0,799 \times 10^6$ células/ml; a mais baixa em Idanha-a-Nova: $0,372 \times 10^6$ células/ml. No entanto, a variável “Concelho” não foi identificada como factor de risco da tCCS. Se extrapolarmos as prevalências de mamites subclínicas a nível de rebanho, segundo as grelhas de Bergonier e Berthelot (2003) com base nas médias concelhias das tCCS, a prevalência estará compreendida de 6% em Idanha-a-Nova, a 20% em Vila Velha de Ródão. Os rebanhos foram estratificados em classes de acordo com a sua dimensão. Detectaram-se diferenças entre classes mas nenhuma exibiu uma mediana de CCS $> 0,5 \times 10^6$ células/ml. A variável “Dimensão do Rebanho” também não demonstrou ser factor de risco da tCCS.

Conclusão: De uma forma global, consideramos que o leite de ovelha produzido na Beira Baixa é de boa qualidade: tCCS média de $0,551 \times 10^6$ células/ml. No entanto, 46 explorações (67,6%) tinham cenários preocupantes de tCCS $> 1 \times 10^6$ células/ml, o que reforça a necessidade da implementação de Códigos de Boas Práticas de Higiene nas explorações, em simultâneo com programas de saúde do úbere em consonância com los regulamentos comunitários de Higiene Alimentar.

[Assessment of beira baixa ewe's milk quality based on SCC]

Objectives: To characterize the Somatic Cell Count (SCC) in Beira Baixa ewes' milk.

Material and methods: SCC was quantified in 685 samples from 68 flocks located at the geographic area of Castelo Branco (PDO) Cheese: counties of Fundão, Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Vila Velha de Ródão, Covilhã and Belmonte. Samples of bulk tank milk were collected at the farms, weekly, from January to May 2007, by technicians of five cheese making plants of the study area: 50 ml of ewes' milk, packed in sterile vials and transported into thermic boxes at 0-4°C to the laboratory. The samples were processed at the Laboratório de Apoio Regional de Alcains by the fluor-opto-electronic method FOSSOMATIC (Foss® 250/360) up to 24 hours after their collection. SCC was recorded for subsequent analysis with SPSS version 15.0.

Results and discussion: The SCC average was $0,551 \times 10^6$ cells/ml; the median was $0,467 \times 10^6$ cells/ml; the minimum value $0,015 \times 10^6$ cells/ml; the maximum value $5,762 \times 10^6$ cells/ml.

This SCC average is a very acceptable value according to the threshold in force in EU countries such as France, Italy and Spain (maximum acceptable SCC varies from 0.5 to 1.0×10^6 cells/ml) and to the U.S.A. standard (maximum acceptable SCC of 1.0×10^6 cells/ml). 12.6% of the samples showed SCC $> 1,0 \times 10^6$ cells/ml; 28,8% SCC between $0,5 \times 10^6$ and $1,0 \times 10^6$ cells/ml; and 58,7% CCS $< 0,5 \times 10^6$ cells/ml.

The highest SCC was recorded at Vila Velha de Ródão: $0,799 \times 10^6$ cells/ml; the lowest at Idanha-a-Nova: $0,372 \times 10^6$ cells/ml. However the variable “County” was not identified as a risk factor for SCC. An extrapolation of the subclinical mastitis prevalence at flock level based on the Bergonier and Berthelot (2003) scale suggests that prevalence may range from 6% at Idanha-a-Nova to 20% at Vila Velha de Ródão. The flocks were stratified into six size categories. Although differences were found, none of the categories showed a SCC $> 0,5 \times 10^6$ cells/ml. The variable “Flock Size” was also not identified as a risk factor for SCC.

Conclusions: Globally the ewes' milk at Beira Baixa showed good quality. However a broad spectrum of values was recorded and 46 flocks (67,6%) had concerning SCC $> 1,0 \times 10^6$ cells/ml.

This points out a high heterogeneity of the farmers' animal health education, of the farm/enterprise goals, of the premises and milking parlour quality, of the biosecurity level of the farms, and in particular, of the mastitis prevention protocols. This remark enforces the urgent need to implement Hygienic Good Practicing at farm level, along with udder health monitoring plans, as it is proposed by the EU regulations on food hygiene.

Dinâmica das imunoglobulinas na defesa da glândula mamária ovina

Queiroga, M.C.¹ e Vilela, C.L.²

1 ICAM, Universidade de Évora

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Além dos prejuízos causados pelos casos de mastites clínicas, a ocorrência de mastites subclínicas provoca diminuição na produção de leite, prejudicando também a sua qualidade de forma a diminuir a rentabilidade queijeira e podendo até constituir risco em termos de saúde pública.

O objectivo deste trabalho foi aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de defesa da glândula mamária nos ovinos, na perspectiva de contribuir para equacionar novas medidas de prevenção e tratamento de mastites, com base em métodos imunológicos.

Foi realizado um estudo para identificar antígenos de *Staphylococcus epidermidis* importantes na resposta imunológica e estudar a respectiva resposta imunológica local e geral em ovelhas infectadas naturalmente.

Catorze isolados foram lisados por acção da lisostafina e de SDS (dodecil-sulfacto de sódio); as proteínas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida e por último transferidas para membranas de nitrocelulose; estas membranas foram incubadas com soros sanguíneos e com soros de leite de ovelhas com mastite a *Staph. epidermidis* e com soros de ovelhas sem infecção intramamária.

Foram reconhecidas proteínas bacterianas por IgG no sangue das ovelhas mastíticas e das ovelhas de controlo, mas não foi encontrado um padrão de epitopos bacterianos reconhecidos nas ovelhas mastíticas que se diferenciava das ovelhas sãs. Houve reconhecimento de proteínas estafilocócicas por IgA no leite dos dois grupos de ovelhas, mas no leite de ovelhas com mastite foi reconhecido um maior número de bandas proteicas. Foram reconhecidas proteínas por IgG no leite de ovelhas mastíticas, mas no leite das ovelhas saudáveis não foram detectadas IgGs específicas para as proteínas em estudo.

Os resultados não revelaram resposta humoral sistémica à infecção intramamária, no entanto, a resposta humoral local foi evidente.

Como Ac específicos no leite das ovelhas, a IgA estava presente em animais infectados e sãos, mas a IgG apenas estava presente em animais infectados. A confrontação dos nossos resultados com os factos referidos nos trabalhos científicos consultados sugere-nos uma hipótese de modelo explicativo para a dinâmica das imunoglobulinas na glândula mamária ovina que será apresentada.

[Immunoglobulin dynamics in the defense of ovine mammary gland]

Clinical mastitis is in account of great economical losses, but subclinical mastitis also leads to lower milk yield and quality which is responsible for diminished cheese production as well as eventual public health treats.

This work aimed at better understanding the defense mechanisms of the ovine mammary gland with the purpose of designing better strategies to control mastitis on the basis of immune modulation.

To study *Staphylococcus epidermidis* antigens and immunological response of ewes, 14 isolates were lysed with lysostaphin and SDS and the obtained proteins were separated by SDS-PAGE. Then immunoblotting was performed with serum and milk whey from ewes with mastitis due to *Staph. epidermidis* and from healthy ewes.

The results showed recognition of bacterial proteins by blood IgG from both mastitic and control ewes, but it was not possible to find a distinctive pattern in the mastitic ewes. Staphylococcal proteins were recognized by IgA in the milk of both groups of ewes, and in the mastitic ewes' milk a higher protein recognition was observed. There was protein recognition by IgG in mastitic ewes' milk, but there was no evidence of specific IgG in the milk of healthy ewes.

No indication of a systemic antibody response to intramammary infection was found, though a local antibody response was patent.

As specific antibodies in the ewes' milk, IgA was present in both mastitic and healthy animals, but IgG was only present in mastitic ewes. These findings, together with previously reported scientific data suggest a hypothesis of immunoglobulin dynamics in the ovine mammary gland that will be presented.

Importância do Ecosistema Montado na sustentabilidade da Agricultura Mediterrânica

Potes, José Mira

ESAS, Santarém; josemirapotes@gmail.com

Procede-se à caracterização do ecossistema Montado evidenciando a integração de múltiplos sub-sistemas que necessariamente terão que manter um equilíbrio para que as respectivas interações não comprometam o funcionamento do ecossistema. A multidiversidade e multifuncionalidade são patentes através dos diversos sistemas de produção que mantêm entre si uma dinâmica que é analisada nos seus aspectos técnicos destacando-se o papel das novas tecnologias, biotecnologias e inovação utilizados nos trabalhos desenvolvidos. Através de um delineamento experimental que permitiu estudar a evolução da pastagem e seu melhoramento, conjugado com o comportamento do animal em pastoreio ao longo de vários anos, foi possível obter resultados no domínio da agronomia e eficiência dos sistemas de produção animal. Estes conhecimentos adquiridos ao nível da parcela associaram-se aos estudos de gestão da exploração, tendo permitido efectuar uma abordagem específica ao melhoramento de pastagens, controlo da flora arbustiva, preservação da componente arbórea e pecuária extensiva, cuja integração e multifuncionalidade conduziram à Rotação do Montado como base estruturante da gestão do ecossistema. Realça-se a contribuição fundamental dos recursos naturais que são complementados pelas culturas forrageiras, representando a intervenção do homem no ecossistema, com um papel de duplo efeito no melhoramento da rotação e do complemento alimentar dos sistemas de produção animal. Surge assim o Esquema Alimentar da Pecuária Extensiva onde a integração é uma evidência e a auto-suficiência um objectivo.

[Importance of Montado Ecosystem in the sustainability of Mediterranean Agriculture]

The paper starts with the characterization of Montado ecosystem with emphasis on the integration of multiple sub-systems that must be balanced for not disturb the function of whole ecosystem. Multidiversity and multifunctionality are present on the multiple production systems with dynamic relationships analyzed by technical aspects with relevance for new technologies, biotechnologies and innovation applied on research. Through the experimental design it was possible the studies of pasture improvement correlated with grazing behaviour for several years and obtain results on agronomy and animal production efficiency. This knowledge on trials level was associated to on farm research allowing specific approach to pasture improvement, shrubs control, tree component preservation and extensive animal production that were integrated on Montado Rotation which is the base of the ecosystem management. The contribution of natural resources is fundamental and complemented with forage crops the human contribution in the management with double effect in rotation improvement and animal feeding. Thus the Feeding Scheme of Extensive Animal Production Systems proves that the integration is an evidence and self-sufficiency an objective.

Sustentabilidade da produção de ovinos em pastoreio. Contributo do Projecto Extensity

Belo, Carlos Carmona

INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

Em Portugal a área ocupada por pastagens permanentes aumentou acentuadamente nos últimos 15 anos, representando em 2005 (INE), 47% da superfície agrícola utilizada (SAU) no Continente. No Alentejo, região em que o projecto “Extensity” – Sistemas de Gestão Ambiental e de Sustentabilidade na Agricultura Extensiva registou um maior número de agricultores aderentes, a área de pastagens atingia, também em 2005 mais de um milhão de ha (57% da SAU). Contudo, cerca de 80% das pastagens actuais são constituídas por espécies espontâneas e, embora cumpram um papel importante para a conservação do solo, representam um fraco recurso alimentar para a população de ruminantes, essencialmente bovinos, que no mesmo período, não parou de aumentar.

Existem muitas explorações em que a carga animal atinge as 0,62 CN por hectare, levando a que os agricultores dedicados à produção de bovinos de carne recorram à produção de forragens anuais e à utilização de concentrados o que, além constituir um maior encargo económico, implica mobilizações do solo podendo afectar a sobrevivência das árvores, que são o suporte fundamental deste sistema de produção.

O projecto “Extensity” além de apoiar o desempenho dos agricultores, desenvolveu a norma de sustentabilidade garantida que, considerando prioritários factores como a protecção do solo, da água, da biodiversidade e a melhoria da rentabilidade das explorações, incentivou a alimentação animal em pastoreio directo, baseada em pastagens permanentes ricas em leguminosas. Os dados relativos ao aumento de matéria orgânica conseguidos por estas pastagens, cerca de 0,2% ao ano, a que corresponde uma estimativa de fixação de 5 toneladas de $\text{CO}_2 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ foram determinantes para a sua aceitação como um dos mecanismos escolhidos para a ajuda ao cumprimento do protocolo de Quioto, por parte do governo de Portugal.

Os ovinos de carne podem ser os grandes utilizadores de sistemas de produção baseados exclusivamente no pastoreio pois, além das suas necessidades alimentares se poderem enquadrar na produção anual de erva, alargada no caso da sementeira de espécies melhoradas, as numerosas raças de ovinos ainda existentes em Portugal, permitem muitas soluções para estes sistemas produtivos ambientalmente sustentáveis.

[Sustainability of grazing sheep production systems. A contribution of the Extensity project]

In Portugal the area with permanent pastures increased greatly over the last 15 years, representing actually 47% of the land utilized for agriculture (LUA). In the Alentejo region, where the Extensity project – Environmental and Sustainability Management Systems for Extensive Agriculture registered the greatest number of participant farmers, the area with permanent pastures reached more than 1 million of hectares (57% of LUA). However, around 80% of those pastures are a mixture of spontaneous species, important for soil conservation but representing a low feed resource for the ruminants, essentially beef cattle, whose numbers increased also greatly over the same period.

There are many farms where the stocking rate reaches 0,62 “standard” cows per hectare and the farmers must cultivate forages and feed cereals for their animals, increasing the production costs and the use of soil tillage, damaging “quercus” thin roots, that might affect tree survival and all the production system.

Besides support the farmers on their activities, the Extensity project developed rules to guaranty sustainability, aiming at maintaining soil and water protection as well as biodiversity and improving the farms economy, encouraging grazing based on permanent pastures rich in legumes. The experimentation data showed increasing levels of soil organic matter when these pastures where used, around 0,2% each year, corresponding to the fixation of 5 ton of $\text{CO}_2 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{year}^{-1}$, and was important for its acceptance as one of the mechanisms chosen to help the government to fulfil the Portuguese Kyoto target.

Meat sheep might be the main users of these grazing production systems, since their feeding requirements may be satisfied exclusively with the annual grassland production and the several Portuguese sheep breeds allow many solutions based on the grazing of these environmental sustainable systems.

Padrões de expressão de proteínas em tecido hepático de ovinos sujeitos a restrição alimentar: um estudo nas raças merino australiano, dorper e damara com recurso a electroforese bi-dimensional e espectrometria de massa

Carvalho, M.R.^{1,2,3}, Coelho, A.V.^{1,4}, Kilminster, T.⁵, Scanlon, T.⁵, Oldham, C.⁵, Greeff, J.⁵, Milton, J.⁶, Alfaro Cardoso, L.¹, Almeida, A.M.^{1,2}

1 Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, Portugal e CIISA-FMV, Lisboa, Portugal

2 Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal

3 Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal

4 Universidade de Évora, Évora, Portugal

5 Department of Agriculture and Food WA, Perth, Austrália

6 University of Western Australia, Perth, Austrália

A Perda de Peso Sazonal (PPS) coloca-se como uma séria limitação para a produção animal em climas Tropicais e Mediterrânicos, condicionando fortemente a actividade pecuária nestas áreas. O estudo dos mecanismos fisiológicos e moleculares pelos quais as raças domésticas respondem à PPS é de grande interesse, com importantes implicações nos programas de selecção animal. Recentemente, a utilização de abordagens proteómicas tem permitido um maior aprofundamento dos mecanismos moleculares ao nível da proteína, numa vasta disposição de mecanismos fisiológicos incluindo os que estão na base da PPS.

O objectivo deste estudo é determinar a expressão proteica diferencial ao nível do fígado de três raças de ovelhas que demonstram diferentes níveis de tolerância à PPS: Merino Australiano (altamente susceptível), Damara (tolerante) e Dorper (situação intermédia). As amostras de fígado foram obtidas de animais dos grupos controlo e sub-alimentados das três raças. A proteína total foi extraída e quantificada. Géis SDS-page foram corridos estando a técnica de electroforese 2D a ser optimizada. O objectivo é obter géis 2D de grandes dimensões para análise, utilizando o software Amersham's imagemaster platinum. As proteínas expressas diferencialmente irão ser identificadas através de PMF (Peptid Mass Fingerprinting) e Maldi-Tof MS/MS.

[Understanding protein expression profiles in the liver of sheep subjected to weight loss: an approach using Proteomics and Mass Spectrometry methodologies in the Australian Merino, Dorper and Damara breeds]

Seasonal Weight Loss (SWL) poses a serious limitation to animal production in Tropical and Mediterranean climates, strongly conditioning agriculture in these areas. The study of the physiological and molecular mechanisms by which domestic animal breeds respond to SWL is of capital interest with important implications in animal selection plans. Recently, the use of proteomic approaches has allowed a much greater insight on the molecular mechanisms at the protein level in a vast array of physiological mechanisms including those underlying SWL. The objective of this study is to determine differential protein expression in the liver levels of three breeds of sheep that show different tolerance levels to SWL: Australian Merino (highly susceptible), Damara (tolerant) and Dorper (intermediate). Liver samples were obtained from both control and underfed, weight-losing animals of the three breeds. Total protein was extracted and quantified. SDS-page gels were run and the 2D electrophoresis technique is currently being optimized. The objective is to obtain large slab 2D gels for analysis using Amersham's Imagemaster platinum software. Differentially expressed proteins will be identified through PMF (Peptide Mass Fingerprinting) and Maldi-Tof MS/MS.

Parâmetros de qualidade da carcaça e da carne de pequenos ruminantes

Cadavez, Vasco

CIMO, Instituto Politécnico de Bragança, Apartado 1172, 5301-855 Bragança; vcadavez@ipb.p

Os sistemas de produção de ovinos e caprinos são muito diversos, resultado dos diferentes ambientes de produção e do grande número de raças exploradas. Em Portugal, a produção de pequenos ruminantes assenta na utilização de raças autóctones, exploradas em sistemas de pastoreio. A valorização dos produtos cárnicos através de marcas de qualidade, tais como: Denominação de Origem Protegida e Indicação Geográfica Protegida; pode contribuir para a preservação das raças autóctones. Pelo papel que desempenha na regulação das trocas comerciais, a qualidade da carcaça reveste-se de especial importância para os produtores e para os talhantes. Os principais parâmetros de qualidade das carcaças são o teor em carne magra, a relação músculo:osso e a proporção de carne vendável. Estes parâmetros podem ser estimados recorrendo a equações de previsão utilizando como estimadores a espessura dos tecidos, bem como por avaliação do estado de engorda por apreciação visual, sistema actualmente em vigor na União Europeia. Por outro lado, a qualidade da carne apresenta especial importância na regulação das trocas comerciais entre os talhantes e os consumidores. Os principais parâmetros de qualidade da carne são a cor (músculo e gordura) e a qualidade sensorial, especialmente a tenrura e o flavour. Neste trabalho faremos uma descrição dos parâmetros de qualidade da carcaça e da carne de pequenos ruminantes.

[Small ruminants carcass and meat quality parameters]

The sheep and goats production systems are very diverse; this diversity results from the differences in production environments and from the great number of sheep and goats breeds. In Portugal, production of small ruminants is based on local breeds raised under extensive systems. The valorisation of meat products through quality brands, like Origin Denomination of Origin Protection and Geographic Indication Protection; can contribute for the preservation of the local breeds. Carcass quality presents an important role in the regulation of the commercial exchanges, and presents special relevance to the producers and to meat sellers. The main carcass quality parameters are the lean meat content, the muscle:bone ratio and the sealable meat proportion. These parameters can be predicted by equations using as predictors the tissues thickness measurements, as well as by degree of fatness evaluated by visual appraisal, system actually in use in the European Union. The meat quality presents special importance for the regulation of the commercial exchanges between meat sellers and consumers. The main meat quality parameters are the colour (muscle and fat) and the sensorial quality; especially the texture and the flavour. In this work a description of the small ruminant carcass and meat quality parameters will be made.

Antibioterapia de infeções multiresistentes I: bactérias Gram-positivas

Pomba, Constança

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A detecção crescente de determinantes de resistência de importância clínica em bactérias isoladas de animais de companhia é inquietante. Tal facto, constitui um risco para a saúde quer de animais quer do homem (Guardabassi et al., 2004). As maiores preocupações constituem por ordem de importância *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), *Staphylococcus intermedius* metilina resistente (MRSI) e *Escherichia coli* multiresistente. A resistência dos estafilococos pode ser atribuída a uma proteína de ligação à penicilina – PLP2a (codificada pelo gene *mecA*), responsável pela resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenams). Estes estafilococos são denominados de metilina resistentes – MRSA ou MRSI, dependendo se são *S. aureus* ou *S. intermedius* (Gortel et al., 1999; Deresinski, 2005). Adicionalmente, as estirpes de MRSA são frequentemente resistentes a várias outras classes de antibióticos (fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e lincosaminas), sendo as opções terapêuticas muito limitadas. Tal como no homem, os animais de companhia podem ser portadores assintomáticos de MRSA na pele e na superfície das mucosas. Desde 1997 tem se registado um aumento crescente de descrições de infeção e colonização por MRSA em animais de companhia em vários países, incluindo os EUA, Canada, Holanda, Reino Unido, Irlanda, Alemanha, Austria, Japão, Coreia e também em Portugal (Pomba, C., dados não publicados). Os isolados de MRSA de animais de companhia da Europa do Norte, Reino Unido e também Portugal normalmente pertencem ao clone epidémico EMRSA-15 (multi-locus sequência tipo 22), responsável por bacteriemia em humanos. MRSA tem sido isolado de diversas infeções de pele e tecidos moles, incluindo abscessos, piodermite, infeções pós-cirúrgicas, fistulas, cateteres endovenosos ou infeções de próteses cirúrgicas. Infeções por MRSA devem ser consideradas num animal se: i) o doente for considerado em risco de infeção zoonótica, por vir de lares MRSA positivos ou pertencer a proprietários que sejam profissionais de saúde, ii) tiver feridas traumáticas ou pós-cirúrgicas infectadas de difícil resolução, iii) próteses cirúrgicas (ex. cateteres, próteses ortopédicas) infectadas, iv) infeções da pele e tecidos moles que não respondem à antibioterapia, v) casos com história prévia de infeção por MRSA, vi) animais em sépsis ou outras infeções invasivas (BSAVA, 2007; Lloyd et al. 2007). Como as manifestações clínicas das infeções por MRSA são variáveis não existe um protocolo terapêutico adequado para todos os animais. O tratamento deve ser adaptado a cada doente individualmente. Na escolha de um plano de tratamento, vários factores devem ser tidos em consideração: i) o perfil de susceptibilidade do MRSA isolado do doente em causa ii) a severidade da infeção, se o doente exhibe sinais sistémicos de doença (febre, leucocitose), iii) as doenças subjacentes ou concomitantes do doente. Infeções superficiais como infeções não complicadas de feridas ou incisões podem ser tratadas com uma variedade de agentes tópicos, incluindo sulfadiazina de prata, ácido fusídico, mupirocina ou uma combinação de sulfadiazina de prata a 1% e 0,2% de digluconato de clorhexidina (Weese, 2005). Sempre que se utilize apenas terapia tópica é necessária uma monitorização apertada da evolução local da infeção e possível aparecimento de bacteriemia e doença sistémica (Weese, 2005). Foram detectadas estirpes clínicas de MRSI resistentes a todos os antibióticos de administração oral disponíveis para o tratamento das piodermites, otites e infeções do tracto urinário em cães e gatos nos EUA, Canada, Eslovénia, Alemanha, Suécia e Portugal (Pomba, C., dados não publicados). O tratamento de infeções por MRSA e também MRSI em animais de companhia é mais difícil do que no homem pela impossibilidade de utilização off-label de antibióticos considerados de importância crítica para o homem (ex. vancomicina, linezolide, estreptograminas, tigeciclina) (FAO/WHO/OIE 2008).

[Antimicrobial therapy of multiresistant infections: Gram-positive bacteria]

There is increasing evidence that clinically relevant resistant traits have emerged in bacteria isolated from small animals and constitute a health risk for both animal and human populations (Guardabassi et al., 2004). The most important concerns by order of importance are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* (MRSI) and multi-resistant *Escherichia coli*. Staphylococcal resistance can be caused by an altered penicillin-binding protein – PBP2a (the resistance carried by the gene *mecA*) responsible for resistance to all beta-lactam antimicrobials (penicillins, cephalosporins, carbapenams). These are known as methicillin-resistant staphylococci-MRSA or MRSI, depending on whether it is *S. aureus* or *S. intermedius* (Gortel et al., 1999; Deresinski 2005). Additionally, MRSA strains are often resistant to various other antimicrobial classes (fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, macrolides and lincosamides) and treatment options may be very limited. As in humans, pets can be asymptomatic carriers of MRSA on the skin and mucosal surfaces. Since 1997 the number of reports on infections and colonization with MRSA from companion animals is increasing in many countries, including the USA, Canada, The Netherlands, the UK, Ireland, Germany, Austria, Japan, Korea and also Portugal (Pomba, C., unpublished data). MRSA isolated from pets in Northern Europe, UK and Portugal usually belong to the epidemic clone EMRSA-15 (multi-locus sequence type 22) that causes bacteraemia in humans. MRSA have been isolated from diverse skin and soft tissue infections including abscesses, dermatitis, post-operative wound infections, fistulas, and intravenous catheter or surgical implant infections. MRSA should be suspected in animals if: i) Patients where a zoonotic risk of MRSA infection has been acknowledged, from known MRSA positive households or that belong to healthcare workers, ii) post-operative and traumatic non-healing wound infections, iii) implant infections (e.g. catheters, orthopaedic implants), iv) skin and soft-tissue infections unresponsive to antimicrobial therapy, and v) cases with a previous history of MRSA infection, vi) animals dying of sepsis or other invasive infections (BSAVA, 2007; Lloyd et al. 2007). As the clinical manifestations of MRSA infections in animals are very variable, there is no treatment protocol which will be suitable for all animals. The treatment must be tailored to the individual patient. When choosing a treatment plan, several factors should be taken into account: i) the susceptibility profile of the MRSA isolated from the animal patient ii) the severity of the infection, whether the patient shows signs of systemic disease (fever, leucocytosis) iii) the patient's underlying disease or any comorbidity. Superficial infections such as uncomplicated wound or incision infections can be treated with a variety of topical agents, including silver sulfadiazine, fusidic acid, mupirocin or a combination of 1% silver sulfadiazine and 0.2% chlorhexidine digluconate (Weese, 2005). Whenever topical therapy alone is used, close monitoring progression of local disease or development of bacteraemia and systemic disease is required (Weese, 2005). Clinical strains of MRSI that are resistant to all oral antimicrobial formulations available for the treatment of pyoderma, otitis and urinary tract infection have been detected in dogs and cats in the USA, Canada, Slovenia, Germany, Sweden and Portugal (Pomba, C., unpublished data). Treatment of companion animal MRSA and also MRSI infections is even more difficult than in humans as off-label use of human critically important antibiotics (FAO/WHO/OIE 2008) (eg. Vancomycin, linezolid, streptogramins, tigecycline) is not allowed.

Acção de neuropeptidos na regulação da circulação ocular

Delgado, E.¹, Marques-Neves, C.², Rocha, I.², Sales-Luís, J.¹ e Silva-Carvalho, L.²

¹ Departamento de Clínica, CIISA, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa

Introdução: A circulação ocular assegura o aporte de nutrientes e oxigénio ao globo ocular e a eliminação dos produtos resultantes do seu metabolismo. Qualquer disfunção na circulação ocular pode ter consequências na funcionalidade do olho e, consequentemente, na visão. Neste trabalho utilizamos um modelo experimental de olho isolado in situ de coelho por nós desenvolvido que permite estudar os mecanismos intrínsecos de regulação da circulação ocular ao eliminar as influências neuronais, definindo como objectivo estudar o comportamento da vasculatura ocular face aos neuropeptidos Péptido Vasointestinal (VIP) e Neuropeptido Y (NPY).

Materiais e métodos: Utilizaram-se 12 coelhos neozelandeses híbridos, de ambos os sexos. As artérias oftálmicas externas foram canuladas e perfundidas com uma solução de tirode morno com o auxílio de uma bomba de perfusão contínua (135 µl/min). O catéter de polipropileno de três vias foi ligado a um transdutor de pressão para avaliar o efeito da pressão intraluminal como uma medida da resistência vascular total. Obtiveram-se curvas-resposta após a injeção intraarterial de 0.1 ml de NPY [200 µg/ml] (Grupo A, n=6) e 0.1 ml de VIP [200 µg/ml] (Grupo B, n=6).

Resultados: Antes da injeção de qualquer fármaco observamos vasomotricidade intrínseca em todos os modelos animais com frequência média de $4,7 \pm 1,71$ por minuto e amplitude média das oscilações foi de $2,1 \pm 1,13$ mm Hg. No grupo A após a injeção de NPY observamos aumento da pressão de perfusão e aumento da amplitude e frequência das oscilações. No grupo B o VIP produziu diminuição da pressão de perfusão, da amplitude e da frequência das oscilações de vasomotricidade intrínseca.

Conclusões: O Neuropeptido Y (NPY) é um neurotransmissor que está presente nos nervos adrenérgicos da coróide e, quando injectado intravenosamente, produz vasoconstrição logo é provável que seja também um co-transmissor ao nível do olho (Greenwood *et al.*, 2000). O Péptido Vasointestinal (VIP), tanto quanto se sabe até ao momento, é um vasodilatador (Loewy, 1990; Ikezaki *et al.*, 1998). Interessa estudar estes e outros potenciais neuropeptidos em termos de efeitos ao nível da circulação ocular, uma vez que pouco se sabe acerca da inervação peptidérgica do globo ocular (Ye *et al.*, 1999). Neste estudo o NPY comportou-se como um vasoconstritor e estimulou a vasomotricidade intrínseca. O VIP, pelo contrário, provocou vasodilatação e contrariou o vasospasmo. Estes resultados poderão ter aplicação clínica futura em termos de diagnóstico/terapêutica de doenças oculares isquémicas em que exista comprometimento da circulação retiniana ou coróideia.

Financiamento: CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal).

[Neuropeptide action on the control of ocular circulation]

Introduction: Ocular circulation is responsible for nutrient and oxygen delivery to the eye and for the elimination of metabolism residues. Any dysfunction in ocular blood flow can have a profound effect on eye physiology and vision. In this work we used an experimental model of isolated rabbit eye previously developed by us to help clarifying intrinsic mechanisms of control of ocular circulation eliminating neural influences. Our aim was to study Neuropeptide Y (NPY) and Vasointestinal Peptide (VIP) effects upon the control of ocular circulation.

Materials and methods: Twelve neozeland white rabbits of both sexes were used. External ophthalmic arteries were cannulated and perfused with warm tyrode with the aid of an infusion pump at a rate of 135 µl/min. The polipropilene catheter was further connected to a pressure transducer to evaluate the effect of intraluminal pressure as a measure of total vascular resistance. Concentration-response curves to intraarterial 0.1 ml of NPY [200 µg/ml] (Group A, n=6) and 0.1 ml of VIP [200 µg/ml] (Group B, n=6) were obtained. All the experimental procedures conformed to the National and European laws on animal experimentation.

Results: Without any drug administration intrinsic vasomotricity was observed in the 12 rabbit models with a medium frequency of 4.7 ± 1.71 per minute and a medium amplitude of the oscillations of 2.1 ± 1.13 mm Hg. In Group A, NPY induced an increase in perfusion pressure and a higher frequency and amplitude of the oscillations. In Group B, VIP produced a decrease in perfusion pressure values and a slower frequency and shorter amplitude of the oscillations of intrinsic vasomotricity.

Conclusions: Neuropeptide Y is a neurotransmitter that is present in adrenergic choroidal nerves and when injected intravenously produces vasoconstriction, so probably it is also a co-transmitter at eye level (Greenwood *et al.*, 2000). Vasointestinal Peptide is, as far as we know, a vasodilator (Loewy, 1990; Ikezaki *et al.*, 1998). It is of the utmost importance to study the effects of these and other neuropeptides on what concerns their potential effects upon the control of ocular circulation, since very little is known about peptidergic innervation of the eye (Ye *et al.*, 1999). In this study NPY behaved as a vasoconstrictor and stimulated intrinsic vasomotricity. VIP, on the other hand, evoked vasodilation and abolished vasospasm. These results may have future clinical relevance in terms of diagnostic/therapeutic of ischaemic eye diseases in which there is impairment of retinal or choroidal circulation.

Support: CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal).

Modulação da circulação ocular por um bloqueador dos canais de cálcio

Delgado, E.¹, Marques-Neves, C.², Rocha, I.², Sales-Luís, J.¹ e Silva-Carvalho, L.²

¹ Departamento de Clínica, CIISA, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa

Introdução: Os fármacos que diminuem o cálcio intracelular inibindo a entrada de cálcio nas células chamam-se bloqueadores dos canais de cálcio. Estes fármacos induzem relaxamento do músculo liso e vasodilatação cerebral, coronária e periférica. A amlodipina é um bloqueador dos canais de cálcio do tipo L, sendo selectiva para o músculo liso vascular e afectando pouco a contractilidade do miocárdio. Possui uma semi-vida plasmática muito mais longa do que as outras dihidropiridinas (30 h no cão) o que origina menores flutuações nas concentrações plasmáticas em administrações prolongadas. Recorremos ao modelo de olho isolado de coelho por nós desenvolvido para estudar os efeitos reguladores locais ao nível da vasculatura ocular da amlodipina isoladamente e em arteríolas pré-contraídas pela endotelina-1 (ET-1).

Materiais e métodos: Após procedimentos experimentais com vista à obtenção do modelo de olho isolado de coelho, no grupo A de 6 animais procedeu-se a duas injeções intraarteriais de amlodipina 0,1 ml [3 mg/ml] intercaladas com duas injeções intraarteriais de fenilefrina [250 µg/ml]. No grupo B de 6 animais procedeu-se à injeção intra-arterial de ET-1 0,1 ml [27 µg/ml], e vinte minutos mais tarde procedeu-se à injeção intraarterial de amlodipina 0,1 ml [3 mg/ml]. Usou-se o teste t de Student para dados emparelhados, tendo sido consideradas significativas as diferenças correspondentes a $P < 0.05$.

Resultados: Observamos vasomotricidade intrínseca inicial em todos as experiências. Após a injeção de amlodipina (Grupo A) observamos intensa diminuição da pressão de perfusão e abolição das oscilações de vasomotricidade intrínseca. No grupo B a ET-1 desencadeou uma curta resposta vasodilatadora seguida de uma resposta vasoconstritora intensa e duradoura. A vasomotricidade tornou-se muito evidente, exibindo oscilações com amplitudes reduzidas e elevadas frequências. A amlodipina administrada em seguida induziu vasodilatação e diminuição da vasomotricidade intrínseca.

Conclusões: Em estudos prévios os bloqueadores dos canais de cálcio aumentaram o fluxo sanguíneo no nervo óptico e na coróide. Alguns estudos em pacientes humanos com glaucoma de tensão normal demonstraram que o tratamento com bloqueadores de canais de cálcio teve efeitos benéficos na prevenção da perda de visão. Estes efeitos poderão ser mediados por acção ao nível das células ganglionares da retina ou por melhoria do fluxo sanguíneo ocular.

No nosso estudo a amlodipina comportou-se como um fármaco vasodilatador e aboliu a vasomotricidade intrínseca presente nas artérias oftálmicas externas do coelho e seus colaterais. A ET-1 aumentou a resistência vascular e a pulsatilidade das oscilações de vasomotricidade intrínseca. Em arteríolas pré-contraídas pela ET-1 a amlodipina diminuiu a resistência vascular e a vasomotricidade intrínseca tornou-se menos evidente, o que revela uma acção protectora contra o vasospasmo, podendo ser uma alternativa terapêutica nas doenças oculares isquémicas com componente vasospástica.

Financiamento: CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal).

[Modulation of ocular circulation by a calcium channel blocker]

Introduction: Calcium channel blockers decrease intracellular calcium inhibiting its entry in the cells. These drugs induce skeletal muscle relaxation and cerebral, coronary and peripheral vasodilation. Amlodipine is an L-type calcium channel blocker selective for vascular wall muscle with a small action on myocardial contractility. It has a longer half life than other dihydropyridines (30 h in the dog) originating less fluctuations. Using a model of isolated rabbit eye we have previously developed, we studied amlodipine effects upon ocular circulation alone and in pre-contracted arterioles by previous endothelin-1 (ET-1) administration.

Materials and methods: After the experimental procedures that lead to the isolated model of rabbit eye, in a group A of 6 animals we performed two intraarterial injections of 0.1 ml of amlodipine [3 mg/ml] intercalated with two injections of phenylefrine [250 µg/ml]. In a group B of 6 animals an intraarterial injection of ET-1 0.1 ml [27 µg/ml] was done, followed twenty minutes later by an injection of 0.1 ml of amlodipine [3 mg/ml]. Data was studied using paired t-test and differences considered significant when $p < 0.05$. All the experimental procedures conformed to the National and European laws on animal experimentation.

Results: Without any drug administration intrinsic vasomotricity was observed in all experiments. In Group A after amlodipine injection we observed a marked decrease in perfusion pressure and abolition of intrinsic vasomotricity. In Group B ET-1 elicited a short vasodilation followed by a strong and long-lasting vasoconstrictor tone. Vasomotricity became very intense, showing oscillations of high frequencies but small amplitudes. With amlodipine that followed we obtained vasodilation and a decrease of intrinsic vasomotricity.

Conclusions: Ca channel blockers have been found to increase blood flow in the optic nerve head and choroid in animal studies. Studies in humans with normal tension glaucoma have shown a beneficial effect in preventing visual field loss by treatment with Ca channel blockers. Whether the useful effects of the Ca channel blocker are mediated through actions on retinal ganglion cells or indirectly through improvement of the ocular blood flow is unclear.

In our study amlodipine acted as a vasodilator and abolished intrinsic vasomotricity present in external ophthalmic arteries and its collaterals in this isolated model of rabbit eye. ET-1 enhanced vascular resistance and caused an increase in pulsatility of the oscillations of intrinsic vasomotricity. In ET-1 pre-contracted arterioles amlodipine decreased vascular resistance and intrinsic vasomotricity became less evident which indicates a protective action against vasospasm and a possible therapeutic role in ocular ischaemic diseases with a vasospastic component.

Support: CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal).

Antibioterapia de infeções multiresistentes I: bactérias Gram-negativas

Pomba, Constança

CIISA, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Quando um doente apresenta uma infeção resistente, refractária ou crítica, podem ser necessárias outras estratégias e antibióticos diferentes dos presentes nos protocolos e normas estabelecidas. Tal como acontece para novas terapêuticas, existem poucos estudos clínicos em medicina veterinária que documentem a sua utilização e posologia e como tal o recurso à extrapolação da medicina humana. O primeiro passo para o tratamento de uma infeção refractária ao tratamento por determinado fármaco é avaliar o porquê do insucesso terapêutico e por que motivo o doente não responde à terapia. Possíveis causas incluem imunossupressão inerente a fármacos ou doença subjacente, outra doença concomitante (ex. Neoplasia maligna ou infeção fúngica), re-infeção após a infeção original ter sido tratada, recaída de infeção prévia por cura ineficaz, presença de bactéria resistente a várias classes de antibióticos, ou identificação bacteriana incorrecta. As bactérias Gram-negativas resistentes mais frequentes na medicina de pequenos animais são os bastonetes Gram-negativos, em particular as *Enterobacteriaceae*. Apesar de em alguns hospitais terem ocorrido surtos de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, e *Proteus* indol positivos, *E. coli* permanece o agente mais frequente. Foram isoladas em animais de companhia em Portugal, Espanha, Itália, EUA, Canada e Australia, *E. coli* multi-resistentes com actividade de β -lactamase de espectro alargado (ESBL) ou de β -lactamase AmpC mediada por plasmídeos associada ou não à resistência às fluoroquinolonas. Algumas estirpes podem se apresentar resistentes a todos os antibióticos excepto a ampicilina associada ou não à resistência ao imipenem. As ESBLs foram identificadas após a introdução nos anos 80 das oximino-cefalosporinas com indicação para a antibioterapia de infeções bacterianas severas. As enzimas CTX-M tornaram-se recentemente as ESBLs dominantes nos isolados humanos na Europa (Livermore *et al.*, 2007), também na bacteriémia adquirida na comunidade e Infeção do Tracto Urinário (Zahar *et al.*, 2007). As beta-lactamases CTX-M (cefotaximases) conferem: alto nível de resistência às aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de espectro estreito de primeira e segunda geração, alto nível de resistência às cefalosporinas de terceira geração e níveis variáveis de resistência às cefalosporinas de quarta geração (Bonnet, 2004). Antibióticos activos contra bactérias patogénicas produtoras de ESBL incluem: carbapenemos, associação de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, como a piperacilina-tazobactam, cefamicinas. A co-resistência pode limitar a utilidade dos aminoglicosídeos, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazole. As bactérias produtoras de ESBL são frequentemente resistentes às cefalosporinas de quarta geração, apesar de exibirem susceptibilidade in vitro. As β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos como as β -lactamases CMY (cefamicinases) pertencem à classe C de Ambler/grupo 1 de Bush, hidrolisam cefalosporinas de espectro alargado e são provavelmente os genes de β -lactamases localizados em plasmídeos mais disseminados em *E. coli* de origem animal e *Salmonella* spp. (X.-Z. Li *et al.*, 2007). Nos animais de companhia, foram pela primeira vez descritas em 1999 nos EUA associadas a infeção nosocomial em cães (Sanchez *et al.*, 2002) e depois mais tarde na Austrália forma detectadas em *E. coli* multi-resistentes num hospital veterinário como agentes causadores de cistite e infeção de feridas pós-cirúrgicas e cutâneas (Sidjabat *et al.*, 2006). Na Europa foram descritas estirpes de *E. coli* uropatogénicas produtoras de CMY-2 (Pomba *et al.*, 2007). Opções terapêuticas disponíveis para as infeções causadas por estirpes produtoras de β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos no homem incluem as cefalosporinas de quarta geração, fluoroquinolonas (se susceptíveis), carbapenemos, aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazole (se susceptíveis) e nitrofuranos. A presença de agentes patogénicos produtores de ESBLs e AmpCs pode ser a consequência do excesso de utilização de antibióticos de largo espectro, que conduz a uma antibioterapia desajustada. As β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos representam uma nova ameaça pois conferem resistência às cefalosporinas de espectro alargado, não sendo inactivadas pelas associações com inibidores de beta-lactamases. O contacto estreito entre os animais de companhia e os seus donos reforça a necessidade de promover estudos coordenados de modo a definir o reservatório putativo destes genes de resistência.

[Antimicrobial therapy of multiresistant infections: Gram-negative bacteria]

When the patient has a resistant, refractory or life-threatening infection, other strategies and drugs different from established regimens and guidelines may be necessary. As with many new treatments, there are few veterinary clinical studies to support a recommended use and dose and many of these details have been extrapolated from human medicine. The first step in treating infections that have not responded to other drugs is to assess why the patient isn't responding. Differential causes may include immunosuppression caused by drugs or some disease, some other concurrent disease (e.g., cancer or fungal infection), re-infection after the original infection has been cleared, relapse of the previous infection because the original one wasn't cleared, a bacteria that is resistant to multiple drugs, or misidentification of the bacteria causing the infection. The most common resistant gram-negative bacteria in veterinary small animal medicine are the gram-negative bacilli, especially the *Enterobacteriaceae*. In some hospitals, there have been outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, and indole-positive *Proteus*, but *E. coli* remains as the most common. Multi-resistant *E. coli* with extended-spectrum β -lactamase (ESBL) or plasmid-mediated AmpC β -lactamase activity and/or fluoroquinolone resistance have been isolated in companion animals in Portugal, Spain, Italy, USA, Canada and Australia. Some strains may be resistant to all antimicrobials agents except amikacin and/or imipenem. ESBLs were identified subsequent to introduction of the extended-spectrum oxyimino-cephalosporins in 1980s for treatment of serious bacterial infections. CTX-M enzymes have recently become dominant ESBLs in human isolates in Europe (Livermore *et al.*, 2007), also in community-acquired bacteraemia and UTI (Zahar *et al.*, 2007). CTX-M beta-lactamases (cefotaximases) provide: high-level resistance to aminopenicillins, carboxypenicillins, ureidopenicillins, and narrow-spectrum first/second generation cephalosporins, high level of resistance to the third generation cephalosporins, variable levels of resistance to the fourth generation cephalosporins (Bonnet, 2004). Antibiotics active against ESBL-producing pathogens include: carbapenems, β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations, such as piperacillin-tazobactam, cephamycins. Cross-resistance may limit the usefulness of aminoglycosides, tetracyclines and trimethoprim-sulfamethoxazole, and ESBL producers are often resistant to fourth-generation cephalosporins, despite displaying susceptibility in vitro. Plasmid-encoded AmpC-like CMY β -lactamases (cephamycinases) belong to the Ambler class C/the Bush group 1, hydrolyze extended-spectrum cephalosporins, and are likely so far the most widespread plasmid-borne β -lactamase genes in animal-derived *E. coli* and *Salmonella* spp. (X.-Z. Li *et al.*, 2007). In companion animals, they were first described in 1999 in the USA associated with nosocomial infections in dogs (Sanchez *et al.*, 2002) and then in Australia in multidrug-resistant *E. coli* detected at a veterinary teaching hospital causing cystitis, post-surgical and wound infections (Sidjabat *et al.*, 2006). In Europe canine and feline uropathogenic *E. coli* CMY-2 producer strains have been described (Pomba *et al.*, 2007). Available therapeutic options for plasmid-mediated AmpC β -lactamase producer strains infections in man include fourth generation cephalosporins, fluoroquinolones (if susceptible), carbapenems, aminoglycosides and trimethoprim-sulfamethoxazole (if susceptible) and nitrofurans. The presence of ESBL-producing pathogens may result in overuse of other broad-spectrum antibiotics, leading to inappropriate antimicrobial administration. Plasmid-mediated AmpC β -lactamases represent a new threat, since they confer resistance to expanded-spectrum cephalosporins and are not affected by β -lactamase inhibitors combinations. The close contact between pets and their owners strengthen the need to promote coordinated studies to define the putative reservoir (human or animal) of these resistance genes.

Parvovírus Canino em Portugal

Vieira, M.J.^{1,2}, Oliveira, J.², Vieira, A.L.², Silva, E.¹, Carvalheira, J.¹, Thompson, G.¹

1 Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

2 Clínica - Clínica Veterinária, Figueira da Foz

O Parvovírus Canino (CPV), agente etiológico da enterite hemorrágica canina, é um vírus de ADN que surgiu no fim dos anos 70. O CPV tem evoluído no seu hospedeiro natural com uma elevada taxa de mutação, o que resultou no aparecimento de novas variantes deste vírus: CPV2a e o CPV2b e que substituíram o CPV tipo 2 (CPV2) original. Uma terceira variante, CPV2c, foi pela primeira vez identificada em Itália em 2000 e encontra-se actualmente a circular na população animal, simultaneamente com as variantes CPV2a e CPV2b. A nova variante CPV2c também já foi descrita noutros países da Europa, tendo sido identificada na Alemanha, Espanha, Reino Unido e Portugal. Muito recentemente foi descrita em Portugal a co-infecção natural de um animal com duas variantes do CPV.

O objectivo do presente estudo consistiu não só na identificação das variantes de CPV em circulação em Portugal, como ainda na determinação da sua distribuição geográfica no país. Foram incluídas neste estudo amostras fecais colhidas de cães com menos de 48 semanas de idade, e que apresentavam sinais clínicos compatíveis com infecção por parvovírus (letargia, anorexia, vomito e/ou diarreia). As amostras são provenientes da zona Norte, Centro e Sul do país e foram colhidas durante o período de Abril de 2006 a Setembro de 2008. Um total de 110 amostras foram submetidas à extracção de DNA total, e com a aplicação do método de PCR foi amplificada uma região VP2 da cápside do vírus utilizando primers específicos e consequente caracterização dos produtos amplificados utilizando enzimas de restrição.

Os resultados obtidos revelam uma incidência acima do esperado da nova variante do CPV, a CPV2c, o que sugere que este subtipo poderá estar a substituir na natureza as variantes CPV2a e CPV2b. Estão em curso estudos que pretendem contribuir não só para a compreensão do significado e consequências epidemiológicas da distribuição dos subtipos do CPV no país, assim como para o esclarecimento da importância clínica destes achados e da eficácia da protecção conferida pelas vacinas actualmente comercializadas.

[Canine Parvovirus in Portugal]

The etiological agent of viral haemorrhagic enteritis in the dog, Canine Parvovirus (CPV) is a DNA virus that emerged at the end of the 1970s. CPV evolved in dogs with a high mutation rate, resulting in the emergence of new variants: CPV2a and CPV2b, which replaced the original CPV type 2 (CPV2). A third variant, CPV2c was identified in 2000 in Italy and is now circulating together with variants 2a and 2b. This new variant, 2c, is now widespread in Europe and was detected in Germany, Spain, United Kingdom and Portugal. Recently, the detection of co-infection with two different variants in the same animal has been reported in Portugal.

The object of this study was to identify the more prevalent CPV variants and their distribution in Portugal. The study sample comprised faecal samples collected from dogs less than 48 weeks of age with clinical signs compatible with parvovirus infection (lethargy, anorexia, vomit and /or diarrhoea). The samples comprised dog faeces from north, central and south Portugal and were collected from April 2006 to September 2008. A total of 110 samples were DNA extracted and a specific VP2 CPV fragment was amplified by PCR and subsequently characterized by restriction fragment-length polymorphism (RLFP). Our findings showed a higher than expected incidence of the new variant of CPV2c. The high incidence of the CPV2c variant in this study suggests that this variant is possibly replacing the more common variants in nature until now, the CPV-2a and CPV-2b. Studies are under way to evaluate the epidemiological significance of these findings, its relation with the clinical signs, outcome of the disease and the efficacy of currently commercially available vaccines used to protect dogs.

Estudo da resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em isolados de *Escherichia coli* uropatogénicos de animais de companhia

Fonseca, J. e Pomba, C.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Objectivos: Este trabalho teve como objectivos a avaliação da frequência dos genes *qnr* de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em isolados de *Escherichia coli* responsáveis por casos de infecção do tracto urinário (ITU) em animais de companhia e a caracterização da susceptibilidade aos antibióticos e dos mecanismos moleculares de resistência subjacentes nos isolados positivos.

Metodologias: Ao longo de dois anos (2004 a 2006) foram recolhidos 61 isolados de *E. coli* de cães (n=41) e gatos (n=20) com ITU na Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Procedeu-se à pesquisa dos genes *qnr* (A, B e S) na totalidade dos isolados através de um método de hibridação ADN-ADN. Não foi detectado nenhum gene *qnrA* ou *qnrS*. Apenas um isolado, obtido numa cultura de urina de uma cadela de 15 anos com cistite recorrente, foi positivo para *qnrB*. A amplificação por PCR e a sequenciação confirmaram a presença da variante *qnrB2* e ensaios de conjugação e electroporação a transferibilidade deste gene. A determinação das concentrações inibitórias mínimas deste isolado, designado FMV5825, para diversos antibióticos revelou um fenótipo de multirresistência, englobando aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina), ácido nalidíxico, fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina), amoxicilina, cefalosporinas (excepto 7- α -metoxi-cefalosporinas), aztreonam, piperacilina, ticarcilina e trimetoprim-sulfametoxazole. Através da amplificação por PCR e sequenciação da região QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) das subunidades GyrA e ParC da ADN girase e topoisomerase IV, respectivamente, foram detectadas substituições aminoácidas previamente implicadas em resistências de alto nível em relação às fluoroquinolonas em *E. coli*: Ser83→Ile e Asp87→Asn, em GyrA, e Ser80→Ile e Glu84→Val, em ParC. Foi ainda determinada a presença de *aac(6')-Ib-cr*, gene implicado na resistência simultânea e de baixo nível a fluoroquinolonas e a aminoglicosídeos. O restante fenótipo de resistência foi atribuído a genes que codificam β -lactamases: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B} e *bla*_{OXA-1}, todos eles transferidos por conjugação para a estirpe receptora.

Resultados: Este estudo detectou uma baixa frequência dos determinantes Qnr em isolados de *E. coli* responsáveis por infecção do tracto urinário em cães e gatos. O gene *qnrB2* foi identificado num isolado multirresistente, em associação com outros genes de resistência com localização plasmídica. Esta é, até à data, a primeira descrição da ocorrência de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em isolados de *E. coli* uropatogénicos em animais de companhia.

[Study of the plasmid-mediated quinolone resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates in companion animals]

Objectives: The aim of the present work was to evaluate the frequency of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates responsible for urinary tract infection (UTI) in companion animals, and to characterize the antimicrobial susceptibilities and underlying molecular mechanisms of resistance of the positive isolates.

Methods: During a period of two years (2004 to 2006), 61 consecutive nonduplicate clinical isolates of *E. coli* were collected from dogs (n=41) and cats (n=20) with urinary tract infection at the Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon. In order to search for the *qnr* genes (A, B, and S) in all isolates, a DNA-DNA hybridization technique was performed. The *qnrA* and *qnrS* genes were not detected. Only one isolate, obtained from the urine of a fifteen years old female dog with recurrent cystitis, was positive for *qnrB*. Subsequent PCR amplification and sequencing confirmed the presence of the *qnrB2* variant. Transformation and conjugation assays demonstrated the transferability of this gene. The determination of the minimal inhibitory concentrations of the FMV5825 isolate towards several antibiotics revealed its resistance to ampicillin, cephalosporins (except 7- α -methoxy-cephalosporins), aztreonam, piperacillin, ticarcillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, nalidixic acid and fluoroquinolones (ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin), and aminoglycosides (amikacin, gentamicin, tobramycin). The amplification by PCR and sequencing of the QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions) of the GyrA subunit of DNA gyrase and of the ParC subunit of Topoisomerase IV, detected aminoacid substitutions previously implicated in high level resistance to fluoroquinolones in *E. coli*: Ser83→Ile and Asp87→Asn, in GyrA, and Ser80→Ile and Glu84→Val, in ParC. This strain was also found to harbour the *aac(6')-Ib-cr* gene, associated with a low level resistance to this class of antibiotics and to aminoglycosides. The resistance shown by FMV5825 to other antibiotics was connected to the presence of genes encoding for β -lactamases: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B} e *bla*_{OXA-1}, all of them transferred into the receptor cells by conjugation assays.

Results: This study has detected a low frequency of the Qnr determinants among *E. coli* isolates responsible for urinary tract infections in cats and dogs. The *qnrB2* gene was identified in a multiresistant isolate, in association with other resistance genes of plasmidic location. This is the first report of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrB2* gene in uropathogenic *E. coli* isolates from companion animals.

Patologias mais relevantes em ruminantes de extensivo

Mira, José Costa

Escola Superior Agrária de Beja, Instituto Politécnico de Beja

A produção de ruminantes em extensivo torna-os mais vulneráveis a determinadas doenças derivadas da dificuldade de controlo do ambiente em que vivem. Algumas resultam da exposição a vectores e hospedeiros intermediários transmissores de doenças, outras da variabilidade dos factores climáticos que influenciam qualitativa e quantitativamente a alimentação e, portanto, também a reprodução. Agravando tudo isto junta-se uma vigilância difícil e deficiente, e ainda associada a um maneio complicado.

Neste trabalho pretende-se apresentar as condições de produção de ruminantes em modo extensivo no Baixo Alentejo, Portugal, observados pela óptica do Médico Veterinário clínico, as patologias mais frequentes, especialmente as emergentes resultantes da evolução deste modo de produção. Pretende-se, ainda, discutir algumas soluções experimentadas que devem ultrapassar a actuação clássica de abordagem à doença, entender a saúde de um rebanho como o somatório da saúde individual dos seus componentes e estabelecer um sistema que tem que ser simples e de fácil execução de vigilância com análise de pontos fortes e pontos fracos com o intuito de estabelecer planos de prevenção e previsão do aparecimento da doença.

[Most relevant pathologies in ruminants in extensive way of production]

Ruminants managed in an extensive way become more vulnerable to some diseases due to the difficulty to control the environment they live in. Some problems result from direct exposure to vectors and intermediate hosts, others from variation in the weather, which results in quantitative and qualitative variation in the availability of food, and therefore, also impacting on reproduction. Making things worse, animal surveillance is difficult and often insufficient and management is complex.

In this paper, we try to present the extensive type of ruminant production as seen in Baixo Alentejo, Portugal, from the practitioner's point of view, and consider the most common pathologies, especially those which are emerging with the evolution of this production system. We also discuss some solutions that should go beyond the classic approach to illness and that lead to an understanding that the health of the herd is the sum of the individual health of its components. We establish a simple and easy system of surveillance focused on strong and weak points aiming to establish key actions to predict and prevent outbreaks of disease.

Assistência veterinária em explorações de engorda intensiva. Oportunidades actuais e perspectivas

Vieira, Ana
Rafael e filho SA, Grupo RF

Com a globalização da informação, o consumidor europeu rapidamente foi sensibilizado para um conjunto de assuntos, tais como a segurança alimentar e a sua relação com a saúde pública, o bem-estar e a saúde animal.

Ficou patente nas últimas crises que atingiram o sector alimentar que os consumidores europeus assumiram um papel activo na segurança alimentar. Por outro lado, também os vários intervenientes nas fileiras dos alimentos de origem animal pretendem desenvolver acções que aumentem os níveis de confiança dos consumidores nos alimentos. A legislação alimentar europeia tem evoluído, na última década, no sentido de garantir aos consumidores um elevado grau de segurança nos alimentos, através de uma responsabilização eficaz de todos os intervenientes na cadeia alimentar.

A carne tem sido considerada como um veículo de transmissão de doenças alimentares ao longo do tempo. No entanto, o espectro de doenças com origem na carne, e com relevância em saúde pública, tem sofrido alterações devido à evolução dos sistemas de produção e processamento da carne.

Uma abordagem contemporânea de análise de risco à higiene da carne requiere que existam medidas de higiene aplicadas aos diferentes pontos da fileira, onde se consigam identificar e mitigar os riscos de doença alimentar. Isto deve reflectir-se na aplicação de medidas específicas baseadas na avaliação de risco, com um grande ênfase na prevenção e controlo da contaminação ao longo da fileira de produção de carne. A aplicação dos princípios HACCP é um elemento essencial (*Code of hygienic practice for meat*, 2005).

As explorações de engorda de bovinos constituem uma fonte significativa de perigos associados com a carne. Existe um grande número de perigos presentes em bovinos de carne destinados ao abate, nomeadamente *E.coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e vários perigos químicos e físicos, e o seu controlo constitui um desafio. Uma abordagem da análise de risco permite a identificação de opções de gestão de risco que podem ter um grande impacto a nível da redução do mesmo quando aplicadas a nível da produção primária.

A nível da gestão de risco nas explorações deveremos considerar: (1) estudo de diferentes medidas de controlo de identificação animal, que permitam a rastreabilidade dos animais até às suas explorações de origem; (2) medidas de controlo que permitam registar dados sobre os processos de produção, incluindo o maneio sanitário e alimentar nas explorações; (3) implementação de códigos de boas práticas do sector e pré-requisitos; e (4) a implementação de uma monitorização eficaz dos agentes zoonóticos nas populações animais. Este último ponto irá implicar uma maior formação dos operadores na identificação de sinais de doença. Nesta apresentação pretende-se, em primeiro lugar, reflectir sobre as questões acima colocadas e apresentar diferentes estratégias que podem ser adoptadas na gestão do risco nas explorações de engorda intensiva.

O desafio que hoje em dia se coloca aos veterinários assistentes de engordas intensivas será assegurar um elevado nível de segurança alimentar e saúde pública ao minimizar a incidência de riscos biológicos, químicos e físicos para os humanos e promover a saúde e bem-estar animal. Estas medidas irão ainda apoiar a economia das nossas explorações de engorda.

Uma forma de cumprir este desafio será através da introdução nas nossas explorações do conceito “*One Health*”. Esta aproximação holística considera tanto a saúde animal como a saúde humana e tem por base a premissa de que “prevenir é sempre melhor que curar”.

[Veterinary assistance in feedlots. Today’s opportunities and perspectives]

With the globalization of information, the European consumer has rapidly become aware of a group of problems, which include food safety and public health as well as animal welfare and health. European consumers are currently assuming a much more active role in food safety, as it was shown in the latest food crisis. Concurrently, the different sectors of production of food of animal origin are becoming increasingly active in undertaking control activities to increase consumer confidence in the food they eat. In the last decade, the European legislation has evolved through an efficient responsabilization of all parts involved in the food chain, which lead to a higher degree of confidence in the high security patterns of the food we eat.

Meat has traditionally been viewed as a vehicle for a significant proportion of human food-borne disease. However the spectrum of meat-borne diseases of public health importance has changed due to a change in the production and processing systems.

A contemporary risk-based approach to meat hygiene requires that hygienic measures should be applied where they will be of greatest value in reducing food-borne risks to consumers. This should be reflected in application of specific measures based on science and risk assessment, with a greater emphasis on prevention and control of contamination throughout the meat production chain. Application of HACCP principles is an essential element (*Code of hygienic practice for meat*, 2005).

The feedlots are a significant source of meat-associated hazards. The control of a number of hazards during primary production, present in animal populations intended for slaughter, often presents considerable challenges, e.g., *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and several chemical and physical hazards. A risk-based approach to meat hygiene includes consideration of risk management options that may have a significant impact on risk reduction when applied at the level of primary production.

Regarding risk management options for feedlots we should consider: (1) the study of different control measures to improve the level of animal identification, which would allow the tracing of animals back to their original farms; (2) control measures to record production processes, including prophylactic protocols and treatments, as well as feeding practices; (3) Develop codes of practice and pre-requisites for the meat sector; and (4) an efficient surveillance system of zoonotic agents in the animal populations which would also require training programmes of the beef farmers in the identification of disease.

With this presentation our objectives are to discuss the questions mentioned above and present the different strategies that can be adopted in the risk management of the feedlots.

The challenge that is put to today’s veterinarians in feedlots is to secure a high level of food safety and public health by decreasing the incidence of biologic, chemical and physical risks to humans and to promote animal health and welfare. These measures would also allow a better support of the economy of our feedlots.

This can be achieved through the introduction of the concept of “*One Health*” in our farms. This holistic approach encompasses both animal and human health, stating that “preventing is better than treating”.

Biossegurança em efectivos de bovinos leiteiros

Bexiga, Ricardo

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Biossegurança é a aplicação de práticas de manejo que reduzem as oportunidades de agentes infecciosos entrarem, ou se disseminarem, num efectivo pecuário (Thrusfield, 2007). Neste texto não nos centraremos em doenças que são abordadas pelas autoridades de saúde animal nacionais ou Europeias, mas antes em doenças que devem ser abordadas pelo produtor, comerciante/importador ou veterinário. É frequente os produtores abordarem a biossegurança de forma incompleta. O caminho fácil que muitos produtores escolhem é confiar na vacinação de todos os animais contra várias doenças e não se preocupar mais com a aquisição de doenças. Esta abordagem é insuficiente e com frequência leva a resultados decepcionantes. Vários passos devem ser tomados para implementar um plano de biossegurança:

1. *Conhecimento do estatuto da exploração em consideração em relação às várias doenças.* Apenas quando esta informação existe podemos tomar medidas apropriadas para evitar adquirir doenças quando animais são comprados para a exploração ou evitar que animais adquiridos sucumbam a doenças endémicas na exploração. A monitorização das doenças deve ser levada a cabo regularmente e pela utilização de técnicas que permitam o conhecimento do seu estatuto na exploração de forma fiável e a baixo custo.

2. *Análise de risco.* Uma análise de risco deve ser realizada para avaliar a probabilidade e severidade das consequências de uma doença entrar na exploração. As medidas de controlo têm custos e por isso não podemos instituir um programa de biossegurança que cubra todas as possibilidades. Doenças que devem ser consideradas ao comprar animais para um efectivo bovino leiteiro incluem: BVD, IBR, salmonelose, paratuberculose, leptospirose, neosporose, micoplasmose (especificamente *Mycoplasma bovis*), mastite (devida a *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae* ou *Mycoplasma spp.*) e dermatite digital. Esta lista está incompleta, com outras doenças a necessitar de consideração se a probabilidade do risco for elevada.

3. *Definição de barreiras à transmissão de doença.* A existência de barreiras físicas à transmissão de doença inclui a presença de instalações para quarentena, a separação de animais de diferentes explorações, monitorização de fomites, controlo de vectores, desinfecção e higiene geral.

4. *Ações tomadas antes da entrada de animais adquiridos.* Estas incluem testagem, vacinação ou tratamento. As limitações destas ações devem ser consideradas. Para diversas doenças a testagem de animais individuais tem pouco valor na tentativa de detectar doenças seja porque o tipo de resposta imunitária não é facilmente detectada pela sorologia ou pela existência de portadores latentes. Nestes casos, a investigação do estatuto da doença na exploração de origem é provavelmente um indicador mais fiável para o animal individual. Devemos também considerar que a vacinação nem sempre previne a infecção e que tratamento não é o mesmo que cura.

O veterinário é um dos intervenientes responsáveis pelo estabelecimento de um protocolo de biossegurança e é visto pelos produtores como a fonte primária de informação acerca de biossegurança. O veterinário deve dar o exemplo e incluir o seu comportamento como parte do plano de biossegurança. Outros intervenientes, nomeadamente a indústria, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de protocolos de biossegurança no futuro.

[Biosecurity on bovine dairy farms]

Biosecurity is the application of management practices that reduce the opportunities for infectious agents to gain access to, or spread within, a food animal production operation (Thrusfield, 2007). In this text we will not focus on diseases that are dealt with by national or European animal health authorities. Rather we will focus on diseases that should be dealt with by the farmer, dealer/importer or veterinarian. It is frequent for farmers to approach biosecurity incompletely. The easy path that many farmers choose is to rely on vaccination of all animals against a number of diseases and not worry further with the perspective of acquiring disease. This approach is insufficient and often leads to disappointing results. Several steps should be taken to implement a biosecurity plan:

1. *Knowledge about the disease status of the farm under consideration.* Only when this information exists can we take appropriate measures to avoid acquiring disease from animals being bought in to the farm or that acquired animals succumb to a disease that is endemic to the herd. Disease monitoring should be carried out regularly and by use of a technique that allows knowledge about the disease status of the herd reliably and at a low cost.

2. *Risk analysis.* A risk analysis should be performed to estimate the likelihood and severity of the consequences of disease entering the herd. Control measures are not without costs, therefore we cannot institute a biosecurity programme that is all-inclusive. Diseases that should be considered when buying in animals into a dairy herd include: BVD, IBR, salmonellosis, paratuberculosis, leptospirosis, neosporosis, mycoplasmosis (specifically *Mycoplasma bovis*), mastitis (due to *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae* or *Mycoplasma spp.*) and digital dermatitis. This list is incomplete, with other conditions needing consideration if the risk likelihood is high.

3. *Definition of barriers to transmission of disease.* The existence of physical barriers to the transmission of disease include the presence of isolation facilities for quarantine purposes, the separation of animals from different herds, monitoring of fomites, control of vectors, disinfection and general hygiene.

4. *Actions taken prior entry of bought in animals.* These include testing, vaccination or treatment. The limitations of these actions should be taken into account. For several diseases, individual animal testing has little value to attempt detecting disease either because the type of immune response is not easily detected through serology or because of the existence of latent carriers. In such cases, investigation of the disease status of the herd of origin is probably a more reliable indicator for the individual animal. One should also consider that vaccination does not always prevent infection and that treatment is not the same as cure.

The veterinarian is one of the stakeholders responsible for the establishment of a biosecurity protocol and is seen by farmers as the primary source of information about biosecurity. Many of the aforementioned pathogens can be transmitted from farm to farm in the veterinarian's overalls or footwear. The veterinarian should set the example and include his/her own behaviour as part of the biosecurity plan. Other stakeholders, including the industry, may play a pivotal role in the development of biosecurity protocols in the future.

Infecções por *Cryptosporidium* e *Giardia* em bovinos em Portugal: Importância clínica e epidemiológica

Mendonça, C.^{1,2}, Almeida, A.³, Delgado, M.L.³, Castro, A.^{2,3}, Correia da Costa, J.M.^{2,3}, Canada, N.¹

1 Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Largo Abel Salazar # 2, Porto

2 Centro para o Estudo de Ciências Animais (CECA), Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão

3 Centro de Imonologia e Biologia Parasitária, INSA, Rua de S.Luis, 16. Porto

Infecções por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* são frequentes em bovinos e em Humanos.

Em Portugal, existe ainda pouca informação epidemiológica sobre a prevalência destes parasitas em bovinos. O objectivo deste estudo é caracterizar em termos epidemiológicos e moleculares as infecções por estes protozoários em bovinos no Norte de Portugal de forma a avaliar o potencial impacto sobre produção animal e sobre a saúde pública.

Amostras fecais foram colhidas de 520 animais em 108 explorações, das quais 338 amostras de vitelos e 182 amostras de bovinos adultos, adicionalmente foi realizado um inquérito a cada exploração. As explorações alvo localizavam-se nas regiões da Beira Litoral e de Entre Douro e Minho sendo as colheitas realizadas entre Outubro de 2004 e Dezembro de 2007. As fezes foram colhidas individualmente e directamente do recto, tendo sido conservadas refrigeradas até ao seu processamento laboratorial. Todas as amostras foram processadas através de métodos de concentração, técnicas de coloração Acid fast para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium*, e de observação microscópica directa de esfregaços fecais para diagnóstico de cistos de *Giardia duodenalis*. Também foi realizada microscopia de Imunofluorescência. A caracterização genética, foi realizada utilizando técnicas de PCR, com amplificação e sequenciação dos genes hsp70 e 18SrRNA do *Cryptosporidium* e \square -Giardina para a caracterização de Assemblage de *Giardia duodenalis*. Setenta e cinco de 338 vitelos foram positivos para *Cryptosporidium* spp., 37 de 338 vitelos foram positivos para *Giardia duodenalis*. Sete de 182 bovinos adultos foram positivos para *Cryptosporidium* spp. e 2 de 182 bovinos adultos foram positivos para *Giardia duodenalis*. Dezasseis de 338 vitelos apresentavam ainda co-infecções destes protozoários. A caracterização molecular dos isolados de *Cryptosporidium* spp. indicou a presença de *Cryptosporidium parvum* em todos eles usando o gene hsp70 e dos isolados de *Giardia duodenalis* indicou 2 isolados Assemblage A2 e 9 isolados Assemblage E. Os resultados por nos obtidos indicam que o *Cryptosporidium parvum* é a espécie prevalente nos bovinos, do ponto de vista clínico esta informação é importante na medida em que *Cryptosporidium parvum* é a espécie mais patogénica especialmente para vitelos provocando enterites severas, sendo também a espécie zoonótica. O Assemblage E da *Giardia* pode igualmente provocar enterite em vitelos com menos de 3 meses assim como a existência de co-infecções *Cryptosporidium* e de *Giardia duodenalis*. A predominância da espécie *Cryptosporidium parvum* deve ser tida em conta de forma a evitar a contaminação das águas superficiais e subterrâneas pois poderá originar infecções nos humanos e nos bovinos.

[Infections by *Cryptosporidium* and *Giardia* in cattle from Portugal: clinical and epidemiological relevance]

Infections by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are very common in cattle and in humans.

In Portugal, there is little information about the prevalence of each one of those species in cattle. The objective of the present work was to characterize the infection by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in cattle from northern Portugal in order to evaluate the potential impact for cattle production as well as their risk for public health.

Faecal samples were collected from 520 animals from 108 farms, being 338 calves 1 samples and 182 adult cattle samples. Additionally, a detailed clinical reported was fulfilled from each farm. All of the farms were from the Beira Littoral and Entre Douro e Minho regions, and samples were collected between October 2004 and December 2007. Faecal samples were collected directly from the rectum and refrigerated until laboratory processing. All of the samples were screened for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* using concentration techniques, and acid-fast staining technique for identification of *Cryptosporidium* oocysts and direct microscopic observation of faecal smears for *Giardia duodenalis* cysts identification, so as immunofluorescence microscopy examination. Polymerase Chain reaction (PCR) methods were employed to genotype each positive sample. Molecular characterization was performed using amplification and sequencing of the hsp70 e 18SrRNA genes of *Cryptosporidium* and \square -Giardina gene for Assemblage determination of *Giardia duodenalis*. Seventy five out 338 calves (22.19%) were positive for *Cryptosporidium* spp. and 37 out 338 calves (10.94%) were positive for *Giardia duodenalis*. Seven out 182 adult cattle (3.85%) were positive for *Cryptosporidium* spp., and 2 out 182 (0.11%) were positive for *Giardia duodenalis*. Sixteen out 338 calves were infected by *Cryptosporidium* and *Giardia* simultaneously. Molecular characterization of the *Cryptosporidium* isolates indicated that all of them were *Cryptosporidium parvum* using the hsp70 and from the *Giardia* isolates, 2 were Assemblage A2 and 9 were Assemblage E.

Results here obtained indicated that *Cryptosporidium parvum* is the prevalent specie in cattle from northern Portugal. From a clinical point of view this is important information because *Cryptosporidium parvum* is the most pathogenic specie for calves causing severe enteritis and is also the zoonotic genotype. Assemblage E of *Giardia duodenalis* may also cause clinical disease in calves younger than 3 months and co-infections between *Cryptosporidium* and *Giardia* as been reported in this study. The predominance of the zoonotic strain *Cryptosporidium parvum* should be taken into account in order to avoid the contamination of the surface and groundwater which may lead to waterborne infections of humans and bovines.

Leveduras prevalentes em mamites bovinas: caracterização fenotípica e genotípica

Correia, J.¹, Marques, S.¹, Silva, E.¹, Pena, T.¹, Santos, I.², Thompson, G.¹

¹ Laboratório de Doenças Infecciosas, UMIB, Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

² Cooperativa Agrícola de Vila do Conde

A mamite bovina constitui um dos problemas mais importantes que afecta os animais produtores de leite e, está normalmente associada a uma enorme variedade de microrganismos. A maior parte dos casos de infecção é de etiologia bacteriana, sendo que a nossa experiência ao longo dos últimos dez anos, tem demonstrado que as infecções por leveduras constituem uma importante parte do problema nas explorações leiteiras na região do Entre-Douro e Minho em Portugal. Interessantemente, casos de mamites com etiologia por fungos têm estado cada vez mais descritos, internacionalmente.

O objectivo deste estudo foi o de identificar e caracterizar as leveduras mais frequentemente isoladas de leite mamítico utilizando técnicas macro e microscópicas, assimilação de substratos e moleculares. Mil e quinhentas e sessenta e três amostras de leite, colhidas entre 3 de Janeiro de 2008 e 4 de Setembro de 2008, na região do Entre-Douro e Minho, provenientes de vacas com mamites subclínicas e clínicas foram analisadas. As amostras de leite foram inoculadas em meios de isolamento gerais para bactérias e todas aquelas que apresentavam colónias características de leveduras eram inoculadas em meio de isolamento específico para fungos. A caracterização fenotípica das leveduras foi baseada em características cromogénicas, morfológicas e bioquímicas (API 20C Aux). Para a caracterização molecular foi utilizado o método de RAPD (random amplified polymorphic DNA) e a digestão de ADN com uma enzima de restrição. Das 128 amostras de leveduras (8,19%) isoladas neste estudo em cultura pura ou mista, somente 63 amostras foram caracterizadas, onde o género *Candida* foi o mais prevalente. As espécies isoladas foram *C. krusei* (38,1%), *C. tropicalis* (25,4%), *C. rugosa* (8,2%), *C. glabrata* (4,8%), *C. kefry* (4,8%), *C. parapsilosis* (1,6%). Não foram identificadas 3 das espécies de leveduras (16,1%) isoladas. Para além das leveduras, as espécies de bactérias isoladas neste estudo foram *Escherichia coli* (6,65%), *Sthaphylococcus* coagulase negativos (8,06%), *Streptococcus* spp. (20,66%), *Enterobacter* spp. (5,95%), *Corynebacterium* spp. (21,43%), entre outros. A utilização de métodos moleculares na análise dos isolados, permitiu a diferenciação de 6 espécies.

Os resultados deste estudo alertam para a necessidade de se prestar especial atenção à intervenção dos fungos na etiologia das mamites bovinas. O envolvimento destes agentes nesta patologia, nas condições desta região, é considerável (8,19%), avaliados não só na perspectiva da saúde animal, perdas económicas, mas mais importante, no potencial perigo para a saúde pública que estes agentes representam, visto estas espécies de leveduras terem sido descritas associadas a processos infecciosos no Homem, com as mais variadas resoluções.

[Prevalent yeast in bovine mastitis: phenotypic and genotypic characterization]

Bovine mastitis is one of the most important problems affecting the milk-producing cattle, and is usually associated with a wide variety of microorganisms. Although most infections are usually a result of bacteria involvement, our experience over the past ten years, has demonstrated that yeast infections are also an important part of the problem on dairy farms in the region of Entre-Douro and Minho in Portugal. Interestingly, cases of mastitis by fungi have been increasingly described in the literature.

The purpose of this study was to identify and characterize the yeast more often isolated from mastitis milk, using macro and microscopic characteristics, substrates assimilation and molecular techniques. One thousand and five hundred and sixty-three samples of milk, collected between January 3, 2008 and September 4, 2008, in the Entre-Douro and Minho, from cows with subclinical and clinical mastitis were analyzed. Milk samples were streaked on general isolation medium and all those with yeast appearance were inoculated in specific medium for fungi isolation. The phenotypic characterization of yeast was based on chromogenic, morphological and biochemical (API 20C Aux) characteristics. The molecular characterization was by the use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) method and digestion of DNA with one restriction enzyme. Out of 128 (8.19%) yeast isolates in this study in pure or mixed cultures, only 63 samples were characterized. The results showed a higher prevalence of yeast in the genus *Candida*. The isolated species were *C. krusei* (38.1%), *C. tropicalis* (25.4%), *C. rugosa* (8.2%), *C. glabrata* (4.8%), *C. kefry* (4.8%), *C. parapsilosis* (1.6%). Three of the yeast species (16.01%) were not identified. Besides yeast, the bacterial isolates more prevalent in this study were *Escherichia coli* (6.65%), coagulase negative *Sthaphylococcus* (8.06%), *Streptococcus* spp. (20.66%), *Enterobacter* spp. (5.95%), *Corynebacterium* spp. (21.43%), among others.

The analysis of the isolates using molecular methods allowed the differentiation of 6 species.

The results obtained in this study suggests for the need to pay special attention to the involvement of fungi in the aetiology of bovine mastitis. The involvement of these agents in this pathology, under the conditions of this region, is considerable (8.19%), what must be assessed not only from the animal health perspective and economic losses, but more importantly, to the potential risk that these agents may represent to public health, because the isolated yeast have been related to infectious diseases in humans with different outcomes.

Factores de risco da hiperqueratose e efeitos desta sobre a saúde do úbere

Sousa, J.¹, Pereira, A.¹, Madeira, H.¹, Gomes, C.², Niza Ribeiro, J.^{1,2}

¹ Segalab, SA

² Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

A produção e acumulação de queratina no canal dos tetos dos bovinos, é uma resposta normal do epitélio do canal dos tetos à perda de queratina causada pela ordenha. No entanto, quando esta resposta é exagerada ocorre a hiperqueratose, que pode aumentar a vulnerabilidade do úbere a novas infecções. O objectivo deste estudo foi caracterizar uma amostra de explorações de bovinos leiteiros quanto à existência de hiperqueratose e observar os efeitos dos principais factores de risco sobre o canal do teto. Outro objectivo foi observar a influência da hiperqueratose sobre as mastites e analisar a existência de alguma associação entre a condição do canal dos tetos e os agentes microbiológicos detectados. As explorações amostradas participavam num programa de controlo da qualidade do leite e receberam duas visitas: uma para colheita de amostras compostas de leite a todos os animais para análise microbiológica, e outra visita para avaliação da hiperqueratose e a caracterização dos seus factores de risco.

Das 17 explorações avaliadas, 71% tinham mais de 20% dos animais com níveis de hiperqueratose altos (2B, 2C e 2D). A prevalência de animais com níveis de hiperqueratose altos, variou entre 5% e 43% nas explorações observadas. Os factores de risco considerados neste estudo que demonstraram estar associados ao aparecimento da hiperqueratose foram a forma, a posição (OR=1,26, p<0,05), o comprimento dos tetos (OR=1,68, p<0,00), o número de lactações (OR=2,72, p<0,00), o número de dias de lactação (OR=2,10, p<0,00), o vácuo de ordenha nas tetinas (OR=1,64, p<0,05). Os dois factores que demonstraram uma relação mais forte com a hiperqueratose foram, a inexistência de retiradores automáticos das tetinas na máquina de ordenha (OR=3,75, p<0,00) e a utilização de desinfectantes dos tetos no final da ordenha (OR=3,41, p<0,00). Foi observado que os tetos com hiperqueratose tiveram um risco maior de sofrerem mastites e esta associação é tanto mais forte quanto maior for o nível de hiperqueratose. Observou-se também que a hiperqueratose influenciava o tipo de agentes que infectava o úbere pois os animais com hiperqueratose, tinham um risco maior de sofrerem infecção por *Enterococcus* spp (OR=2,02, p<0,05), *Enterobacteriaceae* (OR=1,73, p<0,05) e *Streptococcus agalactiae* (OR=2,76, p<0,05) e os animais com níveis baixos de hiperqueratose tinham uma maior probabilidade de não terem nenhuma infecção do úbere (OR=2,42, p<0,00), indicando que a hiperqueratose interfere na eficácia do canal do teto em travar a entrada de microrganismos patogénicos.

Com este trabalho foi possível concluir que a hiperqueratose constitui um problema em muitas das explorações observadas e pode contribuir para o aparecimento de algumas mastites.

[Risk factors of hyperkeratosis and its effects on udder health]

The production and accumulation of keratin in the teat channel is the normal reaction of the teat channel epithelium to certain stimulus such as, mechanical milking. But when this reaction occurs in excessive quantities there is hyperkeratosis that may raise the vulnerability of the udder to new intramammary infections. The objective of this study was to characterize the hyperkeratosis on a sample of dairy farms and observe the effects of the most important risk factors. Another objective was to study the relation between hyperkeratosis and mastitis, and to analyse the existence of any association of teat condition and the microbiological pathogens detected in the milk samples of the observed animals. A small sample of dairy farms involved in a milk quality control program was visited twice, one visit to collect milk samples from each cow for microbiological analysis and another visit to evaluate teat hyperkeratosis and its related risk factors.

Of the 17 dairy farms studied, 71% had more than 20% of the cows with high levels of hyperkeratosis. The prevalence of cows with high levels of hyperkeratosis in the dairy farms visited, varied between 5% and 43%. The risk factors associated with the appearance of hyperkeratosis were, the form, the position (OR=1,26, p<0,05) and the length of the teats (OR=1,68, p<0,00), the number of lactations (OR=2,72, p<0,00), the days in milk (OR=2,10, p<0,00), the milking vacuum in the liners (OR=1,64, p<0,05), and the two most important factors, that had the strongest association with hyperkeratosis were, the existence of automatic liner detachers (OR=3,75, p<0,00) and the disinfection of the teats after milking (OR=3,41, p<0,00). Teats with hyperkeratosis had a higher risk of suffering mastitis and this risk was higher as the level of hyperkeratosis increased. The hyperkeratosis influenced the infections of the udder because the cows with hyperkeratosis had a greater risk of being infected with *Enterococcus* spp (OR=2,02, p<0,05), *Enterobacteriaceae* (OR=1,73, p<0,05), *Streptococcus agalactiae* (OR=2,76, p<0,05) and cows with low levels of hyperkeratosis had a high probability of having no udder infection (OR=2,42, p<0,00) showing that hyperkeratosis weakens the barrier function of the teat channel.

With this work we concluded that hyperkeratosis is a problem in most of the observed dairy farms and it can play an important role in mastitis occurrence.

Micoplasmose bovina na OPP de Vila do Conde: estudo sero-epidemiológico

Raposo, J.C.^{1,2}, Gil, S.², Carneiro, C.², Oliveira, M.², Figueiredo, M.D.¹, Vilela, C.²

1 Bayer Portugal S.A, Divisão de Saúde Animal, Carnaxide, Portugal

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Mycoplasma bovis é um agente patogénico envolvido no complexo respiratório bovino, em mastites, queratoconjuntivites e artrites em bovinos. Tem distribuição mundial, e na Europa é responsável por um quarto a um terço das pneumonias em bovinos. A presença de anticorpos específicos é indicadora de infecção prévia, uma vez que a seroconversão raramente é observada em animais em que *M. bovis* está apenas presente nas vias aéreas. O presente estudo foi realizado na Organização de Produtores Pecuários (OPP) de Vila do Conde, visando esclarecer a epidemiologia da Micoplasmose bovina na referida OPP, com o intuito de melhorar o manejo, tratamento e profilaxia dos efectivos animais. A unidade epidemiológica considerada foi a exploração de bovinos, pretendendo-se determinar a prevalência de explorações com animais seropositivos para *Mycoplasma bovis* na OPP, bem como a prevalência intra-exploração destes animais. Foi efectuada uma amostragem aleatória simples em duas fases: ao nível das explorações e dentro de cada exploração seleccionada. Na primeira fase, foi calculado o tamanho da amostra de forma a determinar a prevalência de explorações seropositivas no universo em estudo (n=61 explorações). Na segunda fase, para cada exploração seleccionada, consoante o seu número total de animais, foi calculado o número de amostras individuais (número de animais) necessárias para determinar a prevalência dentro de cada exploração (n=1992 animais no total das explorações). Foi utilizado o programa Winepiscopes 2.0 para calcular o tamanho da amostra, assumindo um valor de prevalência esperada (P) de 50%, um erro absoluto (L) de 10%, e um nível de confiança (α) de 90% (Winepiscopes 2.0). Tanto as explorações como os animais em cada uma destas foram aleatoriamente seleccionados. Foi efectuada a pesquisa de anticorpos anti *Mycoplasma bovis* segundo um método de ELISA indirecto (Bio-X Mycoplasma Bovis Elisa Kit: Bio K 260). Os resultados, expressos semi-quantitativamente, demonstraram a presença de anticorpos contra *Mycoplasma bovis* em 99% das explorações testadas (n=60). No estudo da prevalência intra-exploração, foi encontrada uma mediana de animais positivos por exploração de 50%. Embora preliminares, estes resultados revelam uma elevada exposição dos bovinos em estudo a *Mycoplasma bovis*, que terá consequências negativas tanto a nível de saúde e bem estar animal, como de rendimento económico da exploração. Em trabalhos futuros, iremos realizar inquéritos a cada exploração de bovinos seleccionada para recolha de dados sobre tipo de exploração, manejo, contacto dos bovinos com outras espécies ou outras explorações, modo de compra e introdução de novos animais, história vacinal e clínica da exploração. Estes dados, em conjunto com os resultados laboratoriais obtidos, poderão permitir a identificação de factores de risco, e assim contribuir para um melhor controlo sanitário dos efectivos animais em estudo, no que respeita a Micoplasmose bovina.

[Bovine mycoplasmosis in the Vila do Conde OPP: sero-epidemiologic survey]

Mycoplasma bovis is a pathogen frequently involved in the bovine respiratory complex, mastitis, keratoconjunctivitis and arthritis. It has a worldwide distribution and in Europe is responsible for one third to one quarter of bovine pneumonias. The presence of specific antibodies to this microorganism indicates previous infection, once seroconversion rarely occurs when *M. bovis* is restricted to the upper respiratory tract. The present study was conducted in the Organização de Produtores Pecuários (OPP) from Vila do Conde, aiming at a better understanding of bovine mycoplasmosis in order to improve herd management, treatment and prophylaxis. The epidemiologic unit considered was the farm. In order to determine the prevalence of herds with seropositive animals, as well the prevalence of seropositive animals within each herd, a simple random sampling was conducted in two stages (cluster sampling): at herd level and within each herd. In the first stage, sample size was determined (n=61 herds) to allow for the estimation of positive herds prevalence in the population under study (n=581 herds). In the second stage, for each selected herd, and according its total number of animals, the number of individual samples to collect (number of animals) was determined in order to estimate the prevalence within each herd (n=1992 animals sampled among all herds). Sample sizes were calculated assuming a predicted prevalence (P) of 50%, an absolute error (L) of 10% and a confidence interval (α) of 90% (Winepiscopes 2.0). The herds as well the animals within each herd were randomly selected. The survey for anti *Mycoplasma bovis* antibodies was performed by indirect ELISA (Bio-X Mycoplasma Bovis Elisa Kit: Bio K 260). The results, expressed semi-quantitatively, showed anti *Mycoplasma bovis* antibodies present in 99% of the tested herds (n=60). Concerning the prevalence within each herd, a median of 50% positive animals was found. Although preliminary, these results suggest a high exposure of the cattle comprised in this study to *Mycoplasma bovis*, which will most likely carry negative consequences to animal health and welfare, as well as to the economic performance of the farms. Future work will consist of questionnaires applied to each herd, to collect data on production indicators, herd management, animal contact with other species or herds, introduction of new animals, purchasing strategies, besides clinical and vaccination history. These data, together with the laboratorial results, may be useful to identify risk factors and so contribute to a better herd health control of bovine Micoplasmosis.

Outros assuntos de interesse em ciências veterinárias

Comunicação por convite

Complexo Respiratório Suíno (CRS). Situação actual em Espanha.

Fraile, Lorenzo

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona

O Complexo Respiratório Suíno (CRS) é, ainda, um importante problema para os produtores de suínos em Espanha. Os agentes patogénicos virais mais relevantes, envolvidos nesta síndrome em Espanha, são o vírus da PRRS (> 85% da prevalência) e o Circovirus porcino tipo 2 (100% da prevalência). Curiosamente, a gripe suína é altamente prevalente em Espanha (> 90%), mas não se considera o seu agente como um patógeno relevante, dentro deste complexo respiratório. Por outro lado, é historicamente considerado, que os patógenos bacterianos, principalmente *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (forma crónica), envolvidos neste complexo respiratório, podem ser secundários às infeções virais e não muito importantes. Contudo, os dados recentes do nosso grupo de trabalho mostram claramente uma associação entre as infeções por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (> 89% da prevalência) e por *Mycoplasma hyopneumoniae* (> 80% da prevalência), com a deteção respectivamente, de pleurite e de lesões cranio-ventrais de consolidação pulmonar, em matadouro. Por este motivo, as estratégias de controlo deste complexo respiratório devem tomar em consideração não apenas os patógenos virais, mas igualmente os patógenos bacterianos (principalmente *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*) envolvidos neste complexo respiratório. Por fim são analisadas, em detalhe, todas as ferramentas disponíveis para controlar o CRS, sob condições de campo em Espanha, focando-se os protocolos de vacinação e antibioterapia, assim como outras ferramentas, tais como o uso de imunomoduladores.

[Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Update on the Spanish situation]

Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) is still an important problem for swine producers in Spain. The most relevant viral pathogens involved in this syndrome in Spain are Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome (>85% of prevalence) and Circovirus porcine type 2 (100% of prevalence). Interestingly, swine influenza is highly prevalent in Spain (>90%) but it is not considered a relevant pathogen inside this respiratory complex. On the other hand, it is considered historically that bacterial pathogens, mainly *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (chronic form), involved in this complex may be secondary to viral infections and not very important in this respiratory complex. However, recent data of our group show that a clear association between *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection (>89% of prevalence) and *Mycoplasma hyopneumoniae* infection (>80% of prevalence) with the presence of pleuritis and cranio-ventral lung consolidation lesions, respectively at the slaughterhouse. For this reason, the strategies to control this respiratory complex must take into account not only the viral but also the bacterial pathogens (mainly *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*) involved in this respiratory complex. Finally it is analyzed in detail all the tools available to control PRDC under field conditions in Spain focus on vaccination and antibiotic programs and other tools such as immunomodulators.

Médicos Veterinários do sector de animais de produção: Passado, Presente e Futuro

Raposo, J.C.^{1,2}, Lorena, M.J.¹, Parente, A.¹, Ferreira, D.¹, Figueiredo, M.D.^{1,2}

1 Bayer Portugal S.A, Divisão de Saúde Animal, Lisboa, Portugal
3 Médico Veterinário

O número de médicos veterinários em Portugal tem vindo a crescer nas últimas 3 décadas, especialmente nos últimos 5 anos. A Ordem dos Médicos Veterinários (OMV) conta actualmente com cerca de 3720 membros activos, dos quais 13% exercem clínica de animais de produção. A área da produção animal em Portugal tem vindo a sofrer alterações estruturais relevantes, o que condiciona a actividade profissional dos médicos veterinários ligados ao sector dos animais de produção. Vários autores têm vindo a discutir o papel e actividade dos médicos veterinários ligados a este sector e a sua adaptação às transformações sofridas na produção pecuária ao longo dos últimos 30 anos, sendo pertinente uma reflexão profunda sobre este tema. O presente trabalho pretende efectuar uma caracterização actualizada dos médicos veterinários ligados ao sector dos animais de produção em Portugal, através da realização de inquéritos individuais aos referidos profissionais. Simultaneamente, com base em informação existente, foi avaliada a evolução do número de médicos veterinários entre 1987 e 2008, bem como a evolução dos efectivos animais e explorações pecuárias em Portugal entre 1987 e 2007.

A população alvo foi o conjunto de Médicos Veterinários do sector dos animais de produção. Foram realizados 109 inquéritos anónimos presenciais, recolhidos por métodos não probabilísticos, constituídos por 14 questões fechadas. As respostas foram introduzidas numa base de dados Microsoft Excel e calculadas as médias aritméticas das respostas obtidas.

As respostas aos inquéritos são apresentadas em função da principal espécie animal com a qual o médico veterinário exerce a sua actividade profissional (Aves, Ruminantes de Leite, Ruminantes de Carne, Animais de Companhia).

Foram analisadas as diferenças entre os veterinários que exercem com diferentes espécies animais, tendo sido avaliada a evolução das explorações pecuárias, número de animais, produção pecuária e médicos-veterinários entre 1987 e 2007. Simultaneamente foi recolhida informação sobre o que vários autores preconizam sobre o futuro dos médicos veterinários do sector dos animais de produção.

Face às transformações no interior da classe médico veterinária em Portugal, às alterações estruturais nas explorações agropecuárias, à evolução das exigências económico-legais ligadas à produção pecuária e à evolução dos conhecimentos técnico-científicos, os médicos veterinários ligados ao sector dos animais de produção têm enfrentado e continuarão a enfrentar transformações relevantes no contexto da sua actividade profissional, pelo que no futuro seria interessante a realização periódica de estudos semelhantes para comparação de resultados e acompanhamento da realidade do sector.

[Livestock veterinarians: Past, Present and Future]

The number of livestock veterinarians in Portugal has been increasing in the last 3 decades, mainly in the last 5 years. The “Ordem dos Médicos Veterinários” (OMV) has presently 3720 active members, 13% of which are livestock veterinarians. The livestock sector in Portugal has been suffering relevant structural changes, affecting the professional activity from the veterinarians connected to the activity. Several authors have been discussing the role and activity from the livestock veterinarians and their adaptation to the transformations occurred in animal production during the past 30 years, being relevant a serious reflection on the subject. The present work makes an actualized characterization from the Portuguese livestock veterinarians, through individual questionnaires to the same professionals. Simultaneously, we evaluated the evolution from the number of veterinarians between 1987 and 2008 and the evolution from animal farms and animal numbers between 1987 and 2007.

The target population has been the livestock veterinarians in Portugal. There have been realized 109 questionnaires in face to face interviews, selected by non-probabilistic methods. The answers have been introduced in a Microsoft Excel database.

The answers are presented according the main specie with which the veterinarian works (Poultry, Dairy Cattle, Beef Cattle, Companion Animals). The differences from the veterinarians working with different species were analyzed, as well the evolution from the number of animal farms, the number of animal and the number of veterinarians in Portugal between 1987 and 2007. Simultaneously it has been made a short review on the future from the livestock veterinarians according to some authors.

Due to the transformations in the veterinarian profession structure in Portugal, to the structural changes in animal farms, to the rising legal-economic requirements in this sector and to the evolution from technical-scientific knowledge, the livestock veterinarians have been facing and will continue to face serious transformations and changes in their profession. It would be interesting to follow their activity reality by similar studies in the future.

O Proteoma do músculo gastrocnemius em Coelho (*Oryctolagus cuniculus*) – Estabelecimento de um mapa de referência

Almeida, A.M.^{1,2}, Campos, A.², Van Harten, S.¹, Cardoso, L.A.¹, Coelho, A.V.^{2,3}

1 Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa & Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras

3 Universidade de Évora, Évora

Em várias espécies, o estabelecimento de um mapa de referência do proteoma de um tecido específico tem sido realizado com o objectivo de se conhecer melhor a distribuição das proteínas nesses mesmos tecidos e organismos. Os referidos estudos são de significância particular em espécies de laboratório tal como ratos ou murganhos, mas recentemente têm-se alargado a espécies de interesse pecuário como bovinos e suínos. O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é uma espécie utilizada como animal de laboratório e como animal de produção. Apesar de existirem inúmeros estudos de fisiologia envolvendo o músculo gastrocnemius em coelhos, nenhum mapa de referência do proteoma deste músculo parece ter estar disponível. Neste trabalho descreve-se o primeiro mapa de referência do proteoma do músculo gastrocnemius em coelho utilizando-se técnicas de electroforese bidimensional e a identificação de proteínas por PMF - Peptide Mass Fingerprinting. Um total de 45 proteínas foram localizadas e identificadas: 1) Proteínas envolvidas na estrutura celular e contractibilidade (actina, miosina ou troponina); 2) Proteínas envolvidas em vias metabólicas (creatina cinase ou enolases e 3) Proteínas de defesa como o α -crystalino. O mapa de referência do proteoma obtido, permite comparações com estudos realizados sob a influência de variáveis fisiológicas ou bioquímicas.

[Establishment of a reference proteome map of the gastrocnemius muscle in the rabbit]

In several species, the establishment of a proteome reference map of a specific tissue has been accomplished in order to allow a better knowledge of the distribution of the proteins in a specific species and tissue. Such studies are of particular significance in laboratory animal species such as rat or mice but in recent years studies have also focused on farm animals particularly swine and cattle. The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is a widely used species as both a production and a model animal. Although muscle physiology studies (especially using the gastrocnemius) abound in the species, no reference proteome map seems to be available. In this work we describe the first reference map of the rabbit's gastrocnemius muscle using both 2D electrophoresis and the identification of proteins through Peptide Mass Fingerprinting (PMF). A total of 45 proteins were localized and identified: 1) Cell structure and contractile apparatus proteins (actin, Myosin or troponin); 2) proteins related with metabolic pathways (creatine kinase or enolase) and 3) Cell Defense proteins like α -crystallin. A reference map for most of the major proteins expressed in this muscle is described enabling possible comparisons with studies under diverse physiological situations.

As “Revoluções Agrícolas” em Inglaterra e em Portugal - evidência zooarqueológica

Davis, Simon J.M.

Laboratório de Zooarqueologia, IPA, (IGESPAR), Lisboa

Um estudo preliminar da variação osteométrica dos restos de ovinos e bovinos recuperados em jazidas arqueológicas do sul de Portugal – região com intensa ocupação Muçulmana durante a Idade Média – revela um aumento de tamanho dos ovinos durante este período, enquanto o aumento das dimensões dos bovinos tem lugar após a reconquista Cristã. A premissa inicial reside no facto do aumento de tamanho de uma linhagem de animais domesticados corresponder ao seu melhoramento ao longo do tempo. O apuramento das raças de ovinos no Al-andalus é facilmente explicado pelo facto de os Árabes apreciarem a carne destes animais. Porém, explicar o melhoramento do gado bovino pelas comunidades Cristãs resulta mais difícil. Provavelmente será um reflexo de uma mudança dietética onde o consumo da carne de ovinos terá sido suplantado pela carne dos bovinos e/ou a necessidade de explorar o seu poder de tracção.

[The “Agricultural Revolutions” in England and in Portugal - zooarchaeological evidence]

A preliminary study of osteometric variation of sheep and cattle remains from archaeological sites in southern Portugal – the part that was once ruled by the Moslems – reveals an increase in size of the sheep in Moslem times and a subsequent increase of the cattle following the Christian conquest. It is assumed that a size increase reflects improvement. Sheep size increase is easy to understand given the Moslems fondness for mutton. The later size increase of the cattle is less easy to understand but could reflect a dietary switch from mutton to beef as well as the need for bovine power.

POSTERS

Controlo sanitário em aquicultura portuguesa

Freitas, S.¹, Pina Fonseca, A.¹, Bernardo, F.¹, Duarte, T.², Martins, H.M.², Albuquerque, T.²

1 Direcção Geral de Veterinária (DGV /DSSPA), L. da Academia Nacional de Belas Artes, n° 2, 1249-105 Lisboa; susana.freitas@dgv.min-agricultura.pt
2 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa; teresa.duarte@lniv.min-agricultura.pt; marina.martins@lniv.min-agricultura.pt

O conhecimento da ictipatologia está em permanente evolução. Em caso de suspeita ou de confirmação de doença, a Direcção Geral de Veterinária (DGV) como Autoridade Sanitária Veterinária Nacional, aplica medidas de contingência adaptadas a cada situação, de forma a evitar a disseminação do agente. A maioria dos agentes patogénicos diagnosticados em aquicultura é de origem microbiana ou parasitária, sendo actualmente controláveis. O controlo passa pela existência de boas práticas de manejo e planos profiláticos e terapêuticos adequados. O plano de vigilância sanitária em aquicultura descrito, abrange uma Vigilância Activa cujo objectivo é em última instância a obtenção de estatuto de indemnidade para a Septicémia Hemorrágica Viral (SHV), para a Necrose Hematopoiética Infecciosa (NHI), para a Necrose Pancreática Infecciosa (NPI), e para a Virémia Primaveril da Carpa (VPC), doenças virais da lista II e da lista III, do Anexo A da Directiva 91/67/CEE de 28 de Janeiro, relativa às condições de polícia sanitária que regem a introdução no mercado de animais e produtos de aquicultura. O estatuto de compartimento ou zona indemne, para as citadas doenças, possibilita o livre-trânsito dos peixes e dos produtos de origem aquícola. A 1 de Agosto de 2008 entrou em vigor a Directiva 2006/88/CE de 24 de Outubro, relativa à Prevenção e Luta Contra Certas Doenças dos Animais Aquáticos, que determina que será necessário proceder no futuro à monitorização de novos agentes etiológicos quer de doenças exóticas quer de doenças não exóticas, carecendo de adaptação à Produção Aquícola Nacional. O plano sanitário inclui igualmente, um sistema de Vigilância Activa que utiliza amostras clínicas obtidas das populações aquícolas, tendo em vista a detecção dos agentes etiológicos responsáveis pelas doenças. Abrange também, um sistema de Vigilância Passiva que inclui a notificação imediata e obrigatória de ocorrência de situações de doença especificada ou outros sinais como a morbilidade e mortalidade. Refere-se a distribuição geográfica das principais pisciculturas de água doce e salgada incluídas na vigilância oficial, e analisam-se os resultados do último rastreio 2007/2008. Como resultado mais relevante da vigilância oficial, sublinha-se que não se registaram notificações de ocorrência ou de suspeita de doenças exóticas ou não exóticas. Perante a negatividade dos resultados obtidos, conclui-se que as pisciculturas analisadas continuam a evidenciar indemnidade em relação às doenças virais rastreadas.

[Health surveillance in portuguese aquaculture]

The knowledge of certain diseases in aquatic animals is in permanent evolution. In case of suspicion or confirmation of disease, the Direcção Geral de Veterinária (DGV) as the National Veterinary Sanitary Authority, will apply measures of contingency suitable to each situation, in order to ensure an early detection of any possible outbreak of an aquatic animal disease, and to prevent the dissemination of the agent. For such an established health surveillance in function of the risks must be undertaken.

The final aim of the Health Surveillance described, is to declare a Disease - Free Status for Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS), for Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN), for Infectious Pancreatic Necrosis (IPN), and for the Spring Viremia of Carp (SVC), listed diseases in list II and list III, of the Annex of the Directive 91/67/CEE of 28 of January, modified for the Directive 93/54/EC of 24 of June. The Disease Free- Status makes possible the free-transit of aquatic animals. On 1st August 2008 entered in force the new Directive 2006/88/EC of 24 of October, on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals, which conclude also control measures in case of emerging and exotic diseases. The health plan also includes an active surveillance which concerns the collection of samples during inspection, in view of the detection of etiological agents for the disease. It also encloses a Passive Surveillance that notifies the occurrence or the suspicion of a listed disease, or observed increased mortality during inspection. As more excellent result of the official surveillance, it is underlined that notifications of occurrence or suspicion of exotic or non-exotic disease were not described. According to the negative results of the virological examinations undertaken, one concludes that the analyzed fish farms continue to evidence indemnity in relation to the listed diseases under targeted surveillance.

Sustentabilidade em aquicultura portuguesa: alternativa viável

Freitas, S., Pina Fonseca, A., Bernardo, F.

Direcção Geral de Veterinária (DGV/DSSPA), L. da Academia Nacional de Belas Artes, nº 2, 1249-105 Lisboa; susana.freitas@dgv.min-agricultura.pt

Os A.A. fazem uma abordagem da situação evolutiva da aquicultura a nível internacional e nacional, assumindo-a desta forma como uma actividade essencial para responder às necessidades de consumo. Compete à Direcção Geral de Veterinária (DGV), na qualidade de Autoridade Sanitária Veterinária Nacional, o controlo oficial dos requisitos aplicáveis aos animais de aquicultura e produtos derivados, assim como à prevenção e à luta contra certas doenças dos animais aquáticos. Assim, mediante uma vigilância sanitária oficial levada a cabo anualmente pela DGV, nas espécies de cultura com maior significado produtivo no mercado Português, confirma-se que não se têm diagnosticado doenças de notificação obrigatória, e que não se tem notificado a ocorrência de doenças ou de suspeita de doenças provocadas por novos agentes etiológicos. No entanto, em caso de suspeita ou de confirmação de doença, a DGV aplicará medidas de contingência de forma rápida e adaptadas a cada situação individual de forma a evitar a respectiva propagação. A confiança dos consumidores na qualidade dos produtos certificados da Aquicultura, é indispensável para a viabilidade social e económica desta actividade. Há que fomentar a diversificação das espécies no âmbito de uma Aquicultura Sustentável, como uma alternativa necessária e viável, (considerando-a como um bom complemento da Pesca) e objectivando a competitividade no mercado internacional.

[Sustainability: a viable alternative in portuguese aquaculture]

The A.A. makes a description concerning the aquaculture evolution at an international and national level, assuming it in such a way as an essential activity to answer to the consumption necessities. The Direcção Geral de Veterinária (DGV) is the National Veterinary Sanitary Authority, which concerns the official control on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. Thus, by means of an official sanitary surveillance taken annually for the DGV, in the species of culture with the highest production in the Portuguese market, one confirms that diseases that are required by law to notify, have not been diagnosed, and that the occurrence of diseases or the suspicion of diseases originated by new etiological agents has not been notified, as well. However, in case of suspicion or confirmation of disease, the DGV will apply fast measures of contingency adapted to each individual situation of form to prevent its dissemination. The confidence of the consumers in the certified quality of Aquaculture products is indispensable for the social economic viability of this activity. It will be necessary to foment the diversification of species in the scope of a Sustainable Aquaculture, as a necessary and viable alternative, (considering it as a good complement of fisheries), which will provide the international market competitiveness.

O Papel do Médico Veterinário na Piscicultura

Mestre, P.M. e Afonso, F.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Introdução: De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e com a Lei Portuguesa, a sanidade dos animais aquáticos é da responsabilidade do Médico Veterinário. A sua formação específica em medicina animal e os seus conhecimentos na área da produção animal garantem-lhe um espaço fundamental neste mercado de trabalho.

Áreas de intervenção do Médico Veterinário na Piscicultura:

Biosegurança - é reconhecidamente um dos pontos fundamentais de prevenção e de controlo da introdução de doenças nos estabelecimentos de aquicultura. Medidas como a construção de barreiras que impeçam o contacto de animais selvagens e predadores com os animais cultivados, a prevenção da introdução de peixe cultivado no meio ambiente e o controlo da introdução de doenças por veículos e pessoal, são algumas das ferramentas que o Médico Veterinário deve utilizar.

Elaboração de planos sanitários e terapêuticos para doenças específicas - permite ao produtor realizar o controlo dos riscos associados à disseminação de agentes patogénicos na exploração e, uma vez enviadas as amostras para laboratório e chegado a um diagnóstico, fazer uma rápida instituição da terapêutica apropriada.

Bem-estar dos animais aquáticos - à semelhança do que acontece com os animais terrestres, este ponto é uma responsabilidade do Médico Veterinário, devendo este assegurar a adopção de medidas que reduzam o stress nestes animais. O Médico Veterinário deve saber dar formação e aconselhar o produtor sobre quais os procedimentos de manejo e gestão mais adequados ao seu tipo de produção, ajudando o produtor a aumentar a produtividade e reduzir os riscos de produção.

Instalação de sistemas de monitorização e o registo de dados - estas ferramentas permitem ao produtor e ao Médico Veterinário monitorizar rotineiramente a qualidade da água quanto aos seus parâmetros físico-químicos (oxigénio dissolvido, pH, compostos azotados, salinidade, temperatura), detectando precocemente eventuais problemas e permitindo tomar as medidas adequadas para os prevenir. O Veterinário deve incentivar e ajudar o produtor a instituir estes sistemas de monitorização, que são uma ferramenta indispensável para ter sucesso na prevenção da mortalidade dos animais aquáticos.

Conclusões: Os Médicos Veterinários devem desenvolver os conhecimentos em aquicultura de forma a intervir correcta e eficazmente na indústria da aquicultura.

[The Veterinary Surgeon in the fish farm]

Introduction: According to the World Health Organization and to the Portuguese Legislation, the Veterinary Surgeon is the responsible for the health of aquatic animals. The Veterinary Surgeon's studies in animal medicine and animal production give him a vital role in the aquaculture business.

Veterinary Surgeon's Intervention areas:

Biosecurity - it's an important way to prevent the introduction of disease into the farm, by ensuring that visitors, staff, vehicles and equipment do not introduce disease into the farm and that appropriate barrier control is in place to prevent the spread of diseases.

Control plans for specific disease threats - allows the fish farmer to minimise the spread of disease in the fish farm. After being informed of the diagnosis of the farm health problems the producer can rapidly establish the treatment for that disease.

Animal welfare - the welfare of fish must be ensured by the adoption of measures to reduce stress. The Veterinary Surgeon must advise the fish producer about aspects of management and husbandry that will improve productivity and minimise the production problems.

Monitoring and recording systems - this systems allow the Veterinary Surgeon on the fish producer routinely monitor the water quality (dissolved oxygen, pH, nitrogen compounds, salinity, temperature) and prevent mortality related with water quality. Veterinary Surgeons should advise and help the producer to install monitoring and recording systems since they are an effective way of reducing fish mortality.

Conclusion: The Veterinary Surgeons should improve their studies in aquaculture to correctly and effectively work in the fish farms.

Anisaquiose: o que interessa saber!

Ramos, P.

INRB IP, L IPIMAR, Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos. Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa

A anisaquiose é uma doença provocada pelo consumo de peixe parasitado com formas larvares viáveis de nemátodes parasitas pertencentes ao género *Anisakis*.

O Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos (INRB, I.P.-IPIMAR) teve, na última década, um papel relevante na elaboração de rastreios epidemiológicos e avaliação do potencial zoonótico destes parasitas em pescado proveniente quer da Costa Portuguesa, quer da indústria de transformação do pescado.

A análise parasitológica incluiu o exame macroscópico dos tecidos e a sua observação pelo processo de transiluminação e a identificação dos parasitas através da observação microscópica das suas características morfológicas.

Verificou-se a presença de formas larvares (L3) de *Anisakis* spp. em várias espécies de peixe, tais como sardinha, carapau, pescada, bacalhau, "redfish", cavala e maruca.

Numa perspectiva de futuro, é importante ter a noção de que apesar de toda a cadeia alimentar do pescado estar abrangida por legislação, a informação do consumidor é um ponto essencial em matéria de segurança e qualidade do pescado. Apresenta-se sob a forma de pergunta-resposta o que interessa saber do ponto de vista do consumidor para a prevenção da anisaquiose.

[Anisaquiosis: what you should know!]

Anisaquiosis may reach humans by ingestion of infected fish when they are consumed raw or not adequately cooked.

In the last ten years, Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos (INRB, I.P.-IPIMAR) had an important action on epidemiological surveys and enquire of zoonotic potential of these parasites.

Parasitological study on food fish and fish products require the visual examination of the fish, transillumination, extraction of the visible parasites and microscopic identification of morphological features.

Anisakis spp. larvae (L3) were identified in different fish species: sardine, horse mackerel, chilean hake, atlantic cod, redfish, chub mackerel and ling.

However, the accomplishment of current Portuguese / European Union regulation and population's information may contribute to reduce the anisaquiosis. A simple but effective control measures is to inform the general public about anisaquiosis and the risk of eating raw or uncooked fish. We present in question-answer form, what is important know about this disease.

Anisakuídeos em pescada, carapau e sardinha provenientes das lotas de Peniche e de Setúbal

Borges, S.¹, Ramos, P.², Pereira da Fonseca, I.¹

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
2 INRB IP, L IPIMAR, Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos. Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa

As anisakuídoses humanas são as doenças causadas por larvas de nemátodes pertencentes à família Anisakidae. O homem infecta-se através da ingestão de peixe cru ou pouco confeccionado e que contenha as larvas L3 viáveis.

Este estudo incidiu na pesquisa de nemátodes parasitas em pescada (*Merluccius merluccius*), carapau (*Trachurus trachurus*) e sardinha (*Sardina pilchardus*), provenientes das lotas de Peniche e de Setúbal. Cada amostra era constituída por 31 exemplares. Os parasitas foram recolhidos da cavidade abdominal, da serosa peritoneal e da massa muscular abdominal. A identificação das larvas até ao género foi feita com base nos caracteres morfológicos.

Foram recolhidos 3703 nemátodes parasitas que foram identificados como larvas L3 do género *Anisakis* (99,94%) e do género *Hysterothylacium* (0,05%).

Neste estudo, as amostras da lota de Peniche apresentaram maior proporção de peixes infectados do que as da lota de Setúbal. O carapau foi a espécie que apresentou maior percentagem de indivíduos parasitados (79,63%), seguida da pescada (51,34%) e por último, a sardinha (3,76%).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, verifica-se que existe risco de anisakuiose associado ao consumo destas espécies de peixe, em cru ou pouco cozinhadas.

[Anisakids larvae in european hake, horse mackerel and sardine from harbour markets of Peniche and Setúbal]

Human anisakidosis are parasitoses caused by Anisakidae L3 larvae. Man acquired infection by ingestion of raw or undercooked fish.

This study focused on the research of nematodes belonging to Anisakidae family, in European hake (*Merluccius merluccius*), horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and sardine (*Sardina pilchardus*), obtained from the harbour markets of Peniche and Setúbal. Each sample was composed by 31 fishes.

After dissection of the individuals, encapsulated or free nematode larvae were collected from abdominal cavity, peritoneal serosa and abdominal muscle and counted.

The identification of L3 larvae was done based on morphological characteristics.

3703 nematodes parasites were collected, being identified as a third stage larvae (L3), belonging to *Anisakis* genus (99,94%) and *Hysterothylacium* genus (0,05%).

In this study, the samples from Peniche harbour market have higher proportions of infected fish than those from Setúbal. Concerning the three fish species, horse mackerel was the one with higher number of parasitic larvae (79,63%), followed by hake (51,34%) and sardine (3,76%).

Based on our results we conclude that there is a risk of anisakuiosis associated with the consumption of these fish species, when row eated or undercooked.

Lesões macroscópicas em Pampo (*Balistes capriscus*) provocadas por Percebes (*Conchoderma virgatum*)

Ramos, P.¹, Ruano, F.¹, Jesus, D.², Cruz, T.²

1 INRB IP, L IPIMAR, Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos. Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa

2 Departamento de Biologia & Laboratório de Ciências do Mar. Universidade de Évora. Apartado 190 7520-903 Sines

O pampo (*Balistes capriscus*) é uma espécie de peixe com interesse comercial, cuja carne é bastante apreciada na gastronomia portuguesa especialmente no litoral sudoeste português, onde o “filete de pampo” é uma especialidade local.

O percebe *Conchoderma virgatum* (Spengler, 1790) (Cirripedia: *Lepadidae*) vive normalmente como epibionte de organismos marinhos pelágicos, tais como cetáceos, tartarugas e serpentes marinhas, peixes e caranguejos, muitas vezes ligados indirectamente através de crustáceos copépodes parasitas (penelídeos e lernídeos). Podem ser ainda encontrados a revestir os cascos de navios, bóias e cordas. Um pampo com 43cm e 1060,25 g capturado na zona da Arrifana, no litoral sudoeste português, apresentava três colónias de percebes com localização distinta, no lado direito da parede abdominal, no canal lacrimal esquerdo e na inserção da barbatana pélvica, numa posição antero-anal.

Os percebes apresentavam-se fixados directamente à pele do peixe. A colónia localizada no canal lacrimal era constituída por 5 exemplares maiores e 2 de menores dimensões fixados no pedúnculo dos anteriores, formando uma massa compacta. Embora na colónia da parede abdominal apenas se tenham observado 2 exemplares, a área de fixação com cerca de 1,5cm de diâmetro era compatível com a presença anterior de maior número de indivíduos.

A pele em torno das colónias localizadas na parede abdominal e na inserção da barbatana pélvica apresentava um halo de congestão com eventual envolvimento bacteriano correspondente a um processo de evolução sub-aguda ou crónica.

Presume-se, devido à presença de irregularidades na pele, que as lesões causadas por um processo traumático na parede abdominal possam ter servido de local de fixação da primeira colónia de percebes. A localização da colónia no canal lacrimal, estrutura óssea, lisa e sem muco terá sido secundária às restantes colónias, tendo os percebes causado queratite traumática.

Pela observação dos órgãos internos foi possível concluir ter havido um longo período de carência alimentar.

A cegueira unilateral e o processo infeccioso de evolução crónica poderão ter diminuído a capacidade do pampo para competir pelo alimento com outras espécies e provocado a consequente perda de condição corporal.

[Macroscopic lesions on Grey Triggerfish (*Balistes capriscus*) by pedunculate Barnacle (*Conchoderma virgatum*)]

The grey triggerfish (*Balistes capriscus*) is a fish species with commercial interest. Its meat is appreciated in the Portuguese gastronomy especially in SW Portugal, where the “fillet of grey triggerfish” is a local speciality.

The genus *Conchoderma* has lower substrate specificity. This species commonly lives as an epibiont on pelagic marine organisms such as cetaceans, marine turtles, sea snakes, fishes and crabs, often indirectly attached by means of parasitic or epibiont crustaceans, without any significant damage to the host. It can be seen on sub-surfaces of drifting objects like ship's bottoms, bouis and buoys.

On May 2008, a grey triggerfish of 43cm and 1060,25g was caught from Arrifana, in SW Portugal. Three colonies of specimens of *Conchoderma virgatum* (Spengler, 1970) (Cirripedia: *Lepadidae*) were found attached to three specific sites, right abdominal external face, at the start of the pelvic fin and left lachrymal channel. In the grey triggerfish, barnacle clusters showed size variations. Large barnacles were attached directly to the tissues of the fish and many smaller individuals were attached to the pedunculates of the larger ones.

A wound would provide a substratum for additional barnacles on the abdominal face and in time could have led to their attachment directly to the tissues of the fish. Apparently, a smooth, hard surface, such the lachrymal channel is a favourable substratum for *Conchoderma virgatum* that had caused keratitis. Surrounding the barnacle attached to the body fish it seems to exist bacterial infections. Lesions were of subacute or chronic nature, consistent with a prolonged clinical course and loss of body conditions. In addition the general condition of the fish was affected by starvation.

This case described the uncommon direct attachment of *Conchoderma virgatum* on grey triggerfish, pointing out to the possible influence on the fish health. Apparently, the presence of the barnacle was a handicap to feeding.

Estudo fenotípico de multirresistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* em tainha (*Lisa ramada*) proveniente do Mondego

Pereira, C.¹, Costa, D.¹, Álvares, S.¹, Coelho, A.C.^{1,2}, Pinto, L.^{1,2}, Pires, M.A.^{1,2}, Carrola, J.³, Matos, M.⁴, Rodrigues, J.^{1,2}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

2 CECAV Portugal

3 Departamento de Engenharia Biológica e Ambiental, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

4 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

O aparecimento de resistência aos antibióticos mais comuns tem-se revelado um problema crescente de Saúde Pública a nível mundial. O objectivo deste trabalho consistiu na caracterização fenotípica da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* em tainha (*Lisa ramada*) provenientes do estuário do Mondego.

Neste estudo, amostras fecais de tainha (*Lisa ramada*) foram semeadas em agar Levine e incubadas a 37°C durante 24h. Dois isolados por placa com características fenotípicas de *E. coli* foram identificados por métodos bioquímicos. Efectuou-se o estudo de sensibilidade a 16 antibióticos por sistema disco-placa (NCCLS, 2007). Obtiveram-se 44 isolados de *E. coli* a partir das 24 amostras de fezes. A resistência foi superior a 50% para o ácido nalidíxico e tetraciclina (ambos 65,9%), sendo a percentagem de resistência a ampicilina (45,5%) muito próxima dos 50%. Para a estreptomicina e trimetoprim-sulfametoxazol os valores de resistência foram de 31,8%, ficando a percentagem de resistência ao cloranfenicol pelos 27,3%. Não se encontrou resistência à amicacina, gentamicina e tobramicina.

A elevada prevalência de multirresistência a antibióticos em *E. coli* de tainhas pode contribuir para a transmissão de resistência à população humana.

[Phenotype of multiple antibiotic resistance in isolates of *Escherichia coli* in mullet (*Lisa ramada*) from Mondego River]

Antibiotic resistance is a serious problem concerning Public Health in the world. The aim of this work was study phenotype of multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mullet (*Lisa ramada*) from the Mondego River. A total of 24 mullet (*Lisa ramada*) faecal samples were recovered. The samples were suspended in sterile saline solution, seeded on Levine agar plates and incubated 24 h at 37°C. Two colonies per sample, with typical *E. coli* morphology, were selected and identified by classical biochemical methods. Antibiotic susceptibility was performed by the agar disk diffusion method as recommended by the NCCLS (2007) and a total of 16 antibiotics were tested. Two isolates per sample were recovered obtaining a total of 44 *E. coli* isolates the 24 faecal samples analysed. A high level of resistance was detected to tetracycline (65.9%) and nalidixic acid (65.9%) and ampicillin (45.5%). To streptomycin and trimethoprim-sulfamethoxazole the percentage of resistance found were 31.8%, and to chloramphenicol of 27.3%. No resistances were detected for amikacin, gentamicin and tobramycin.

The high level of resistance to antibiotics in *E. coli* in mullet can contribute to the transmission of resistance to humans.

Influência da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do rio Febros na resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* em amostras fecais de peixes

Álvares, S.¹, Costa, D.¹, Pereira, C.¹, Coelho, A.C.^{1,2}, Pinto, L.^{1,2}, Pires, M.A.^{1,2}, Carrola, J.³, Matos, M.⁴, Rodrigues, J.^{1,2}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

2 CECAV Portugal

3 Departamento de Engenharia Biológica e Ambiental, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

4 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

A transmissão de bactérias resistentes a antibióticos dos animais aos humanos é um problema crescente em Saúde Pública. O objectivo deste trabalho consistiu em comparar a resistência a antibióticos em *Escherichia coli* obtida a partir de fezes de peixes colhidos antes da entrada de um efluente do rio Febros na ETAR (input) com a de *E. coli* obtida a partir de peixes colhidos a jusante da ETAR (output).

Colheram-se 49 amostras de fezes de peixes provenientes do rio Febros. As amostras foram suspendidas e homogeneizadas em solução salina estéril. Foram semeadas em agar Levine e incubadas a 37 °C durante 24h. Isolaram-se duas colónias com morfologia típica de *E. coli* por placa, que posteriormente identificaram-se por métodos bioquímicos clássicos. Efectuou-se o estudo de sensibilidade a 16 antibióticos por sistema disco-placa de acordo com as normas recomendadas (NCCLS, 2007). Efectuou-se o teste de χ^2 para comparar a diferença entre grupos independentes.

Obtiveram-se 51 isolados de *E. coli* a partir das 49 amostras de fezes. Em todos os antibióticos testados encontrou-se maior percentagem de resistência nos isolados provenientes de amostras colhidas a jusante do efluente no rio Febros. No caso dos antibióticos tobramicina, gentamicina, cloranfenicol e cefoxitina só foi observada resistência em isolados a jusante. As diferenças encontradas na resistência ao antibiótico ácido nalidíxico foram altamente significativas ($P=0,000$; $\chi^2=14,875$) assim como, para o antibiótico tetraciclina ($P=0,000$; $\chi^2=23,906$). Os resultados sugerem uma reflexão sobre a influência das ETARs na disseminação de resistência aos antibióticos.

[Influence of Residual Water Treatment Station (RWTS) of Febros River in the antibiotic resistance in isolates of *Escherichia coli* faecal fishes samples]

Antimicrobial-resistant bacteria and the transmission of antimicrobial resistance to animals and human has become a major Public Health problem. The aim of this study was to compare the antibiotic resistance in *Escherichia coli* obtained from feces of fishes gathered before the entry of an effluent of the River Febros in the Residual Water Treatment Station (RWTS) (input) with the antibiotic resistance of *E. coli* obtained from fishes gathered downstream from the RWTS (output).

A total of 49 faecal samples from fishes from Febros River were recovered. The samples were suspended in sterile saline solution, seeded on Levine agar plates and incubated 24 h at 37 °C. Two colonies per sample, with typical *E. coli* morphology, were selected and identified by classical biochemical methods. Antibiotic susceptibility was performed by the agar disk diffusion method as recommended by the NCCLS (2007) and a total of 16 antibiotics were tested. Two isolates per sample were recovered obtaining a total of 51 *E. coli* isolates from the 49 faecal samples analysed.

In all *E. coli* isolates were found a higher percentage of resistance in samples gathered downstream from the RTWS in the River. Resistance to tobramycin, gentamicin, chloramphenicol and cefoxitin was only observed in downstream. The differences found in the resistance to nalidixic acid was highly significant ($P=0.000$; $\chi^2=14.875$) as well as for the antibiotic tetracycline ($P=0.000$; $\chi^2=23.906$). The results suggest a reflection on the influence of the RWTS in the transmission of resistance to the antibiotics.

Evolução do perfil lipídico e índice de condição em moluscos bivalves submetidos a longos períodos de depuração

Ruano, F.¹, Ramos, P.¹, Quaresma, M.², Pereira da Fonseca, I.²

1 INRB IP, L IPIMAR, Laboratório de Patologia dos Animais Aquáticos. Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Introdução: A produção nacional de bivalves provém, na sua maioria, de áreas classificadas na classe A. Porém, uma fracção importante da produção tem origem em estuários e lagoas costeiras, classificadas maioritariamente como classe B. Esta classificação obriga à depuração dos bivalves proveniente destas zonas com vista à redução da contaminação bacteriana e melhoria da qualidade do produto final. Em períodos longos de depuração, o stress fisiológico e traumático podem ser responsáveis pelo enfraquecimento e morte dos bivalves.

Com o objectivo de identificar e quantificar o efeito da privação alimentar durante as 72 horas de depuração, após estudos anteriores de contaminação experimental de bivalves com oocistos de *Cryptosporidium parvum*, procedeu-se ao controlo do perfil dos ácidos gordos e à determinação do Índice de Condição (IC), em três espécies de bivalves, amêijoia macha (*Venerupis pullastra*), mexilhão (*Mytilus edulis*) e berbigão (*Cerastoderma edule*).

Material e Métodos: No ensaio usaram-se amostras constituídas por cerca de 150 indivíduos de cada espécie, provenientes dos estuários dos rios Tejo e Sado e Lagoa de Albufeira. Para determinação do IC recolheram-se, aleatoriamente, duas sub-amostras às 0h e às 72h. Para a análise do perfil de ácidos gordos, as sub-amostras foram colhidas às 0h, 24h, 48h e 72h.

Resultados e Conclusões: O IC ao longo das 72 horas de depuração apresentou uma descida acentuada em todas as espécies, tendo sido o berbigão e mexilhão as espécies mais afectadas. A evolução do teor de lípidos totais ao longo da depuração foi marcada por uma progressiva redução nas três espécies em estudo, embora a amêijoia-macha tenha apresentado a maior redução (24%), comparativamente com o berbigão (20%) e o mexilhão (15%). Esta última espécie foi a que melhor resistiu à perda de peso provocada pela depuração. No que respeita à variação dos somatórios das principais classes de ácidos gordos: Saturados (SFA), Monoinsaturados (MUFA) e Poliinsaturados (PUFA), os resultados não parecem indicar que o padrão de variação das diferentes famílias de ácidos gordos seja constante para as espécies estudadas. Apesar da necessidade de estudos mais aprofundados, a variação observada no IC, no teor de lípidos totais e no perfil de ácidos gordos parece indicar que o stress e a privação de alimento durante a depuração dos bivalves diminuem o seu valor nutricional, na medida em que o processo induz a mobilização das reservas corporais com a consequente diminuição de todos os componentes do perfil lipídico.

[Evolution of the lipid profile and index of condition in mollusc bivalves submitted to a long range depuration procedure]

Introduction: Most of the Portuguese bivalves production is gathered from open sea beds along the coast, located in A class areas. However an important component is produced in aquaculture parks located in interior waters (estuaries and coastal lagoons), most of them classified as B class during 2007. This fact compels the production to a depuration process, in order to reduce bacteriological contamination levels, achieving a significant improvement of quality for this live product. During this process, a physiological and traumatic stress can be induced, causing weakness and deaths on bivalves, especially during the longest periods. Considering earlier studies on experimental infection of bivalves with *Cryptosporidium parvum* oocysts, and in order to identify and quantify the effect of starvation on live bivalves submitted to long periods of depuration, we measured the evolution of lipid profile and the Condition Index (CI) in three different bivalve species, *Mytilus edulis*, from rafts in Albufeira coastal lagoon, common edible cockle, *Cerastoderma edule*, from natural beds in Sado estuary and carpet shell clam, *Venerupis pullastra* from natural beds in Tejo estuary.

Material and Methods: Approximately 150 bivalves of each species, divided in 6 different sub samples were used on the experiments. For the determination of IC two subsamples were collected at 0h and 72h. Concerning the analysis of fat acids profile, subsamples were collected at 0h, 24h, 48h and 72h.

Results and Remarks: The evolution of IC along the 72h of the depuration showed a significant decrease at all species being the mussel and the common edible cockle the most affected species.

The evolution of the whole lipid component during depuration was marked by a continuous decrease on the three species of this study, despite the carpet shell clam presented the highest reduction (24%), regarding cockle (20%) and mussel (15%). In what concerns the total amount of the main classes of fatty acids, Saturated (SFA), Monounsaturated (MUFA) and Polyunsaturated (PUFA), the results apparently do not indicate that the variation pattern had been constant for the different families of fatty acids, in the different species in study. On other hand, the loose of weight due to the depuration was lower in mussels, comparing with the other species.

In spite of the necessity to carry on more accurate studies in this area, the variations shown by the IC, the level of the total lipids and the profile of fatty acids seem to point out that the stress and the food shortage induced by depuration, reduce the nutritional value of the bivalves, mainly because this process increases the mobilisation of corporal reserves and consequently diminishes the global components of the lipid profile.

Infeção parasitária dos asininos da raça de Miranda em 2005 e 2008

Sousa, S.¹, Rodrigues, J.², Silva, A.¹, Pimentel, M.¹, Madeira de Carvalho, L.M.³

1 Escola Universitária Vasco da Gama, Estrada da Conraria. 3040-714 Castelo Viegas – Coimbra; ramalhosousa@gmail.com

2 AEPGA - Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino, Largo da Igreja. 5225 - 011 Atenor

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt .

Os asininos da Raça de Miranda representam um património genético único no nosso País. Considerando que a Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (AEPGA) tem vindo a desenvolver cuidados de manejo e planos de desparasitação destes animais, pretendemos com este trabalho comparar os resultados do estudo parasitológico realizado em 2005 com os resultados obtidos em 2008.

Em Julho de 2005 foi efectuada a colheita de 127 amostras fecais de asininos que nunca tinham sido submetidos a programas de desparasitação e em Fevereiro de 2008, foram colhidas 85 amostras em animais que, ao longo deste período de tempo, foram submetidos a um plano de desparasitação com ivermectina a 2%.

O diagnóstico coprológico e a determinação do nível de infecção parasitária (NIP) por strongilídeos foram efectuados pelo método de McMaster modificado, referido por Madeira de Carvalho (2001), com a contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG).

Em 2005, foram observados ovos de tipo strongilídeo em 110 (87%) das 127 amostras analisadas. No total das 110 amostras positivas observou-se um NIP fraco em 17,30%, com contagens inferiores a 400-500 OPG, um NIP médio em 11,8% das amostras, com valores de 500 e 1000 OPG, um NIP forte em 30,9%, com 1000 a 2500 OPG, um NIP intenso em 25,5%, com 2500 a 5000 OPG, e um NIP muito intenso em 14,5%, com contagens superiores a 5000 OPG. Estes resultados permitiram concluir que 70,9% das amostras apresentou um NIP forte a muito intenso.

Em 2008, a taxa de positividade foi de 38,8%, observando-se ovos de strongilídeos em 33 das 85 amostras analisadas. Das 33 amostras positivas observou-se um NIP fraco em 45,4% das amostras, NIP médio em 36,40% e um NIP forte em 18,2%. Não se observaram amostras com valores superiores a 2500 OPG. Estes resultados permitiram concluir que 81,8% das amostras analisadas apresentou níveis de infecção parasitária fraco a médio e apenas 18,2 % das amostras apresentou NIP considerado forte.

Com este trabalho, verificou-se que em 2005 a maioria dos animais apresentava um NIP de forte a muito intenso (1000 a > 5000 OPG), enquanto que em 2008 o nível de infecção parasitária baixou para valores entre fraco a forte (<400 a 2500 OPG).

[Parasitic infection of Miranda do Douro donkey breed in 2005 and 2008]

Miranda do Douro donkey breed represents a unique genetic heritage in our country. Knowing that AEPGA (Association for the Study and Protection of Donkey Livestock) has been improving care and management programs with antiparasitic treatments of animals, the aim of our study was to compare results of coprological tests performed in 2005 with those obtained in 2008.

In 2005, 127 faecal samples from donkeys with no antiparasitic treatment were tested and in 2008, 85 samples were tested, from animals treated during these 3 years, with ivermectin at 2%.

Quantitative coprological test with evaluation of Infection Parasitic Level with strongilids was based on calculation of eggs per gram of faeces (EPG) according to McMaster modified method, described by Madeira de Carvalho (2001).

In 2005, we observed strongylid type eggs in 110 animals, 87% of tested samples. On total positive samples, the infection parasitic level was low in 17.3% with EPG counts lower than 400-500, medium in 11.8% with EPG counts between 500-1000, high in 30.9% with EPG counts between 1000-2500 and its was very high in 14.5% with EPG counts above 5000. Considering these results it was possible to conclude that 70.9% of samples presented a strong infection parasitic level.

In 2008, the positivity rate of strongilid type eggs was 38.8%. On total positive samples, infection level was low in 45.4%, medium in 36.4% and high in 18.2%. Any tested sample showed EPG counts higher than 2500.

We can conclude that the strong infection parasitic level observed in 70.9% of tested animals in 2005, declining during these 3 years to a weak infection parasitic level in 81.8% of tested animals.

Infeção por Estrongilídeos em asininos de Carviçais – Torre de Moncorvo

Sousa, S.¹, Henriques, C.¹, Loução, L.¹, Ferreira, E.¹, Madeira de Carvalho, L.M.²

1 Escola Universitária Vasco da Gama, Estrada da Conraria, 3040-714 Castelo Viegas – Coimbra; ramalhosousa@gmail.com

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt .

Com este trabalho, pretendemos realizar um estudo parasitológico em asininos de explorações tradicionais de Carviçais, Concelho de Torre de Moncorvo. O estudo parasitológico consistiu no diagnóstico de infecção gastrointestinal por strongilídeos, assim como no cálculo do número de ovos por grama de fezes e ainda na observação da biodiversidade da população parasitária natural.

Durante os meses de Fevereiro e Março de 2008 procedemos à recolha de amostras fecais a 11 asininos adultos, com mais de 2 anos de idade, do sexo feminino em explorações tradicionais de Carviçais – Torre de Moncorvo.

O exame parasitológico das fezes foi efectuado de acordo com o método de McMaster modificado com a determinação do número de ovos por grama de fezes (OPG). A coprocultura foi realizada pelo método de Roberts & O'Sullivan, referido por Madeira de Carvalho (2001). As larvas infectantes foram identificadas de acordo com as características morfológicas referidas em chave dicotómica por Madeira de Carvalho (2001).

Em 8 das 11 amostras analisadas foram observados ovos de tipo strongilídeo. A contagem de OPG variou entre 50 a 3300 no total de amostras positivas, o que se traduz num valor médio de 650 OPG considerando-se assim médio o índice de infecção parasitária (500 a 1000 OPG).

Após identificação das larvas infectantes do terceiro estágio de desenvolvimento (L3), observou-se uma ocorrência de 100% de *Cyathostomum sensu lato* seguida de *Strongylus vulgaris* (59%), *Trichostrongylus axei* (41%), *Gyalocephalus capitatus* (20,7%), *Strongylus equinus* (3,2%) e *Poteriostomum* spp. (1%).

É evidenciada uma grande biodiversidade do género *Cyathostomum sensu lato* sendo o morfotipo A observado em 100% das amostras, seguido pelos morfotipos C (11,7%), D (9,6%), H (9,6%), E (6,4%) e F (3,2%).

[Strongyle infection in donkeys from northern of Portugal – Torre de Moncorvo, Carviçais]

This work aimed the study of gastrointestinal parasites in donkeys, in rural farms from Carviçais -Torre de Moncorvo, including a qualitative and a quantitative method for calculation of number of eggs per gram of faeces (EPG) and also the evaluation of biodiversity among natural parasitic population.

Between February and March 2008, 11 faecal samples were collected from donkeys, females and older than 2 years. Qualitative coprology methods and EPG counts with McMaster slide were performed according to Madeira de Carvalho (2001). L3 larval stages were isolated after faecal culture and identified following procedures described by Madeira de Carvalho (2001).

Strongilids eggs were present in 8 of 11 tested samples. EPG counting in all of positive samples varied from 50 EPG counts to 3300 EPG counts with an average counting of 650 EPG. These results showed a medium rate of parasitic infection (500 to 1000 EPG).

Larvae identification showed a very high frequency of *Cyathostomum sensu lato* (100%), followed by *Strongylus vulgaris* (59%), *Trichostrongylus axei* (41%), *Gyalocephalus capitatus* (20.7%), *Strongylus equinus* (3.2%) and *Poteriostomum* spp. (1%).

In *Cyathostomum sensu lato* genus a large biodiversity was found with L3 morphotype A observed in 100% of samples followed by C (11.7%), D (9.6%), H (9.6%), E (6.4%) and F (3.2%).

Parasitismo gastrointestinal em explorações de equinos no Norte Alentejano: resultados preliminares

Baptista, A.M.L.¹, Gomes, L.², Minas, M.¹, Santos, R.¹, Gouveia, A.¹, Madeira de Carvalho, L.M.²

¹ Escola Superior Agrária de Elvas, Avenida 14 de Janeiro, s/n, Apartado 254, 7350-903 Elvas; anabapti@gmail.com

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt

O controlo anti-helmíntico em equídeos passa cada vez mais por uma caracterização do risco parasitário da exploração e por um conhecimento dos parasitas gastrointestinais mais prevalentes. Atendendo a que o Alentejo é uma região com um importante sector coudélico e com poucos estudos parasitológicos a nível equino, procurou-se avaliar esta situação no Norte Alentejano. Os objectivos do trabalho foram a avaliação do tipo e nível de parasitismo gastrointestinal mais prevalente nesta zona e o grau de eficácia das desparasitações efectuadas.

Foram seleccionadas 7 explorações coudélicas (3 centros hípicas e 4 coudelarias), dos concelhos de Elvas, Fronteira, Campo Maior, Barbacena, Monforte e Arronches, num total de 40 equídeos estabulados e 25 em pastoreio.

O reconhecimento parasitológico foi efectuado com exames coprológicos qualitativos (flutuação e sedimentação natural) e quantitativos (câmara de McMaster para determinação do número de ovos/grama de fezes dos estrongilídeos intestinais, OPG) e coproculturas em copo para identificação de larvas infectantes do 3º estágio (L3). A eficácia da desparasitação foi verificada através do Teste de Redução da Contagem de Ovos Fecais (TRCOF).

Para a distribuição de frequências de OPG para 0, > 0 a 500, > 500 a 1000, > 1000 a 2000, > 2000, os resultados foram os seguintes: 47,5%, 17,5%, 5%, 10% e 20% em animais estabulados (52,5% positivos) e 16%, 4%, 16%, 24% e 40% em animais em pastoreio (84% positivos), respectivamente.

Relativamente à prevalência de géneros baseada nos ovos dos diferentes helmintos o resultado foi o seguinte: ovos de *Strongylidae* 88%, *Triodontophorus* spp. 12%, *Parascaris* 4% e *Anoplocephala* 4%. No que diz respeito à prevalência dos diferentes géneros/espécies de L3, foram registadas as seguintes prevalências: nos estabulados, *Cyathostomum sensu latum* 70%, *Poteriostomum* 9%, *Oesophagodontus robustus* 15%, *Strongylus equinus* 3%, *S.edentatus* 6%, *Triodontophorus* 3%, *S.vulgaris* 18%; em pastoreio, *Cyathostomum sensu latum* 95%, *Poteriostomum* 5%, *S. equinus* 10%, *S. edentatus* 10%, *Triodontophorus* 10%, *S.vulgaris* 75%. As L3 de *Cyathostomum sensu latum* foram as mais abundantes nos dois grupos de equídeos, com 99% das larvas observadas e uma prevalência média de 83%, constituindo o género preponderante nos equinos desta zona do Alentejo. Para verificar a eficácia dos anti-helmínticos, foram seleccionados dois grupos de equídeos, um em pastoreio com 12 animais e outro estabulado com 9 animais, cuja média de OPG era de 4572 e 1691 respectivamente, funcionando cada grupo como controlo e tratamento. Procedeu-se à desparasitação dos dois grupos com Ivermectina injectável e em pasta oral, respectivamente nos em pastoreio e nos estabulados, obtendo-se após 14 dias da desparasitação todos os animais negativos, sendo a eficácia deste fármaco de 100%.

Trabalho financiado pelo CIISA/FMV/UTL

[Gastrointestinal parasitism in horse facilities of North Alentejo: Preliminary results]

The anthelmintic control in horses is increasingly a matter of parasitic risk characterization associated with update knowledge of the most prevalent gastrointestinal parasites. Since the Alentejo region is an important region concerning horse production, but with few studies in equine parasitology, our research aimed a better assessment of this issue in northern Alentejo. The objectives of the study were to assess the type and level of gastrointestinal parasitism more prevalent in this area and the effectiveness degree of performed dewormings. 7 horse facilities were selected (3 Equestrian Centres and 4 horse stud farms), located in the counties of Elvas, Fronteira, Campo Maior, Barbacena, Monforte and Arronches and 40 stabled equines and 25 horses on the pasture were studied. The parasitological evaluation was based on qualitative (fluctuation and natural sedimentation) and quantitative (McMaster slide technique to count the number of eggs per gram of faeces of intestinal Strongyles, EPG,) faecal tests, together with glass faecal cultures to identify the 3rd stage infective larvae (L3). The effectiveness of dewormings was checked through Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT).

The frequency distribution of EPG was according to the following classes: 0, > 0 to 500, > 500 to 1000, > 1000 to 2000, > 2000. The results were as follows: 47.5%, 17.5%, 5%, 10% and 20% for stabled horses (52% positives) and 16%, 4%, 16%, 24% and 40% in grazing equines (64% positives), respectively.

Regarding the prevalence of genera based on the eggs of different helminths, the result was as follows: *Strongylidae* eggs 88%, *Triodontophorus* spp. 12%, *Parascaris* 4%, *Anoplocephala* 4%. With regard to the prevalence of different genera/species of L3, the following results were recorded: in stabled horses, *Cyathostomum sensu latum* 70%, *Poteriostomum* 9%, *Oesophagodontus robustus* 15%, *Strongylus equinus* 3%, *S.edentatus* 6%, *Triodontophorus* 3%, *S.vulgaris* 18%; in grazing equines, *Cyathostomum sensu latum* 95%, *Poteriostomum* 5%, *S. equinus* 10%, *S. edentatus* 10%, *Triodontophorus* 10% and *S.vulgaris* 75%. The L3 of *Cyathostomum sensu latum* were the most abundant in both horse groups, being 99% of the identified larvae, with an average prevalence of 83%, constituting themselves as the dominant genus on horses in this zone of Alentejo. To verify the anthelmintic efficacy, two horse groups were selected, one with 12 grazing animals and other with 9 stabled animals, whose average EPG was 4572 and 1691, respectively, each working as control and treatment group simultaneously. The deworming of both groups with Ivermectin, subcutaneous injection and oral paste, in grazing and housed horses, respectively, resulted in all animals negative 14 days after anthelmintic administration, being this drug 100% effective. Research funded by CIISA/FVM/TULisbon.

Infecção por *Anaplasma phagocytophilum* em cavalos

Gomes, J.¹, Rebêlo, E.¹, Dumler, J.S.³, Santos, A.S.²

1 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

2 Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

3 Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA.

Anaplasma phagocytophilum (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) é uma bactéria intracelular obrigatória dos granulócitos, que é transmitida por ixodídeos e infecta uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados, nomeadamente os animais domésticos como os equídeos e os ruminantes, animais silvestres mas também tem sido reconhecida como agente zoonótico. Nos equinos, é responsável pela Ehrliquiose Granulocítica Equina (EGE) e era anteriormente conhecido por *Ehrlichia equi*.

Estudos serológicos e de biologia molecular indicam que este agente está presente em muitos países europeus nos quais se inclui Portugal. Num estudo realizado no CEVDI/INSA, no âmbito dum trabalho de doutoramento subordinado a este tema, foi possível detectar infecções por *A. phagocytophilum* em ixodídeos e numa égua do Distrito de Faro, provando pela primeira vez a existência do agente no nosso país e sugerindo a possibilidade de ocorrência de EGE. Neste trabalho faz-se uma breve descrição clínica da doença assim como a apresentação dos resultados do estudo mencionado, no que se refere aos dados dos equinos. Pela técnica de Imunofluorescência Indirecta foram identificados anticorpos contra *Anaplasma phagocytophilum* em 4,26% (9/211) cavalos de Portugal continental. Numa das amostras positivas por IFI foi possível detectar, por PCR, a presença de DNA de *A. phagocytophilum*.

[*Anaplasma phagocytophilum* infection in horses]

Anaplasma phagocytophilum (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) is an obligate intracellular bacteria of granulocytes that is transmitted by ticks and infects a wide-range of vertebrate hosts, including domestic animals such as equines and ruminants, wild animals, and is also recognized as a zoonotic agent. In equines, it is the etiologic agent of equine granulocytic ehrlichiosis (EGE), and was formerly known as *Ehrlichia equi*.

Serological and molecular studies show that the agent is present in several european countries, including Portugal. In a study performed at CEVDI/INSA, infections by *A. phagocytophilum* were detected in ticks and in a mare from Faro District, proving for the first time the presence of this agent in our country and suggesting the occurrence of EGE. In the present work, the authors present a brief description of the clinical disease and the results obtained in the later study, regarding the equine data. By indirect immunofluorescent assay, antibodies against *A. phagocytophilum* were detected in 4.26% (9/211) horses from mainland Portugal, Moreover, in one of the IFA-positive samples the amplification of *A. phagocytophilum* DNA was achieved by PCR.

Modelo biomatemático determinístico (“Anthelmintic Resistance Program”) de avaliação da resistência aos anti-helmínticos dos estrongilídeos dos equídeos

Cernea, M.¹, Cernea, C.L.¹, Madeira de Carvalho, L.M.², Cozma, V.¹

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania, mscernea@yahoo.com, www.Pharma-Logic.ro

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt

Vários métodos têm sido descritos e utilizados para detecção de resistência aos anti-helmínticos na estrogilidose equina com diferentes graus de sensibilidade e de confiança. Independentemente dos métodos utilizados, estes têm vantagens, bem como desvantagens, razão pela qual vários autores tentaram adaptá-los a fim de aumentar a sua precisão e velocidade. Todos estes inconvenientes, determinaram a criação de um programa de computador original " Anthelmintic Resistance Program - ARP", “Programa de Resistência aos Anti-Helmínticos”, concebido para eliminar erros na interpretação dos dados. Este programa informático permite para o Teste de Eclosão de Ovos (EHA) e para o Teste de Desenvolvimento Larvar (LDA), os cálculos de percentagem de eclosão dos ovos em diferentes concentrações e a diluição de referência para benzimidazóis, tetrahidropirimidinas e lactonas macrocíclicas, a representação da curva de referência de redução; determinação da dose letal 50 (DL50) ou concentração letal 50 (LC50); análise gráfica da curva de redução, o cálculo do Factor de Resistência (RF), bem como o risco de resistência às várias substâncias testadas. Para o Teste de Redução da Contagem de Ovos Fecais (FECRT) é possível calcular o desvio padrão, a percentagem de redução e o intervalo de confiança de 95%.

A análise in vivo de resistência aos Benzimidazóis dos estrongilídeos dos equídeos pelo FECRT, realizada em 2003-2008 em 992 animais pertencentes a 22 populações equinas na Roménia, revelou a presença deste fenómeno de resistência para Mebendazol (MBZ), Febendazol (FBZ) ou Albendazol (ABZ) em 66,7% dos casos.

A resistência in vitro dos estrongilídeos dos equídeos aos fármacos anti-helmínticos através da utilização de EHA e LDA (para as mesmas populações de cavalos nas quais foram realizados testes in vivo), foi detectada em 77,3% da população estudada. A nossa análise estatística utilizando o programa ARP, estabeleceu a correlação entre os testes FECRT e EHA ou LDA de 86,3%, quantificada através de modelo biomatemático. O “Anthelmintic Resistance Program” - www.Pharma-Logic.ro -, criado e utilizado pela primeira vez na Roménia, permitiu a análise numérica, biostatística e gráfica dos dados obtidos em testes de resistência in vivo e in vitro, tornando possível a avaliação de risco para o animal ou para a população equina expostos, no que diz respeito à possibilidade de ocorrência de espécies de estrongilídeos resistentes aos anti-helmínticos.

[Deterministic bio-mathematical model (“Anthelmintic Resistance Program”) of resistance evaluation in equine strongyles]

Several methods have been described and used to detect anthelmintic resistance with differing sensitivity and reliability in horse strongylidosis. Regardless of the employed methods, these have advantages as well as disadvantages, reason why various authors tried to adapt them in order to increase the precision and speed. All these inconveniences determined the creation of an original computer program “Anthelmintic Resistance Program – ARP” meant to eliminate errors in data interpretation. This computer program allows for egg hatch assay (EHA) and larval development assay (LDA), the calculations regarding hatching percentage of eggs in various concentrations and reference dilution of benzimidazoles, tetrahydropyrimidines and macrocyclic lactones; the representation of the reference curve of reduction; determination of the lethal dose 50 (DL50) or lethal concentration 50 (LC50); graphical analysis of the reduction curve, calculation of Resistance Factor (RF), as well as the risk of resistance to the various tested substances. For the Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) is possible to calculate the standard deviation, the reduction percentage and the 95% confidence interval. In vivo analysis of strongyle resistance to benzimidazole by FECRT, performed in 2003-2008 on 992 animals belonging to 22 horse populations from Romania, showed the onset of resistance phenomenon to Mebendazole (MBZ), Fenbendazole (FBZ) or Albendazole (ABZ) in 66.7% of studied cases.

In vitro horse strongyle resistance to anthelmintic drugs (for the same horse populations where in vivo tests were performed) was detected by EHA and LDA, showing 77.3% of resistant samples of the studied population. Our statistical analysis using ARP, established that the correlation between FECRT and EHA or LDA tests was 86.3%, quantified through a bio-mathematical model.

The Anthelmintic Resistance Program - www.Pharma-Logic.ro -, created and used for the first time in Romania, allowed numerical, biostatistical and graphic analysis of data obtained with in vitro and in vivo resistance tests, making possible the risk assessment for the exposed animal or equine population with regard to the possibility of occurrence of resistant horse strongyle species.

Existem “períodos ótimos” para manipular os poldros?

Figueiredo, I.¹, Costa, H.², Meireles, J.¹, Rosa, I.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
² Fundação Alter-Real, Coutada do Arneiro, Alter-do-Chão

Há provas que sugerem que a manipulação de poldros (experiência precoce) influencia o comportamento dos cavalos posteriormente como adultos. Por isso, parece ser importante identificar os períodos ótimos para a manipulação dos poldros com procedimentos simples, capazes de afectar a reacção ao homem, a sua capacidade de aprendizagem e a sua maneabilidade. Os objectivos deste estudo eram testar os efeitos de 3 sessões dum tipo de manipulação precoce durante três períodos diferentes da vida inicial do poldro. Os poldros Lusitanos (n=46) foram colocados num de cinco grupos e três dos grupos de poldros foram manipulados durante períodos específicos. O primeiro grupo (n=8) foi manipulado como no período neonatal (PN), o segundo (n=9) durante o desmame (PD), o terceiro (n=12) durante o primeiro mês (PO), enquanto que um quarto grupo (n=9) foi mantido sem manipulação até ao início das sessões de treino e o quinto grupo (n=8) serviu como controle (PC). Após os períodos de manipulação e um mês após o desmame os poldros participaram em 4 sessões de treino (foram treinados a colocar a cabeça e a serem conduzidos). As testagens ocorreram duas vezes: uma pouco antes de começarem as sessões de treino e outra após estas terem terminado. Não houve diferenças entre os grupos manipulados quando testados antes das sessões de treino. No entanto, após a manipulação, houve diferenças significativas entre os grupos PN, PD e PC. Os grupos PN e PD reagiram menos ($p<0,005$), toleraram melhor a presença humana ($p<0,005$) e mostraram menor actividade locomotora na presença do manipulador ($p<0,005$). O grupo PD foi mais fácil a colocar a cabeça durante todas as sessões de treino e foi o único grupo que passou todos os objectivos. Em geral, parece que três sessões de manipulação podem ser suficientes para moldar o comportamento do poldro se realizadas durante períodos específicos ou “períodos críticos”. Os poldros manipulados precocemente são menos reactivos e os manipulados ao desmame são mais manejáveis.

[Are there “optimal timeframes” for handling foal (*Equus caballus*)?]

There is evidence to suggest that handling young horses (early life experience) seems to influence the horse's behaviour later during adulthood. It may be important therefore to identify the optimal timeframes to handle young horses with simple procedures, which are likely to affect the horse's fearfulness, learning performance and manageability. These study aims were to test the effects of 3 sessions of an early type of handling during three different timeframes of the foal's early life. Lusitanian foals (n=46) were assigned to one of five groups and three of the foal groups were handled during specific timeframes. The first group (n=8) was handled as neonates (NF), the second (n=9) during weaning (WF), the third (n=12) during the first month (OF), while a fourth group (n=9) was left unhandled (UF) until the beginning of training sessions and the fifth group (n=8) served as control (CF). Following the handling periods and 1 month post-weaning, the foals participated in 4 training sessions (they were trained to halter and to lead). Testing occurred twice: once just before the training sessions started, and again just after they ended. There were no differences between handled groups when tested before the training sessions. However, after handling, there were significant differences between NF, WF and control groups. NF and WF groups reacted less ($p<0.005$), tolerated the human approaches better ($p<0.05$) and showed less locomotor activity in the handler's presence ($p<0.05$). The WF group was easier to halter during all training sessions and was the only group that passed all aims at the final test. In general, it seems that 3 handling sessions are enough to act on foal's behaviour, if performed in specific periods, named “optimal timeframes”. Neonatal handled foals are less reactive and foals handled at weaning more manageable.

Utilização de temperatura elevada e manipulação do pénis para colher sémen num garanhão com problemas de ejaculação em vaginas artificiais: caso clínico

Rocha, A.¹, Atayde, L.¹, Guimarães, T.¹, McDonell, S.²

¹ Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

² New Bolton Center, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania

Colheu-se sémen de um garanhão da raça Holsteiner, activo no circuito de concurso de obstáculos, utilizando uma vagina artificial (VA) com uma temperatura interna de 45 a 50 °C. Após esta colheita, fizeram-se mais de 30 tentativas de colheita de sémen, nas seguintes 4 épocas reprodutivas, com 2 a 5 tentativas/dia. Utilizou-se sempre éguas em cio como montas, e vaginas artificiais dos modelos Colorado, Missouri e Hannover, com e sem bainha plástica de protecção interna, combinando temperaturas da vagina de 45 °C a 50 °C com diversos graus de pressão. No total obtiveram-se apenas 3 amostras de sémen (volumes de 30 a 50 mL, motilidade progressiva [MP] de 0 a 60% e concentração de 77 a 109 x 10⁶ espermatozóides/mL). Ocasionalmente, obtiveram-se amostras de fluido opaco/amarelado, sem ou com raros espermatozóides, imóveis. O garanhão denotou sempre libido elevada, executou enérgicos movimentos de intromissão, mas nunca teve comportamento típico pós-ejaculatório, mesmo quando se obtiveram as 3 amostras com sémen. O garanhão nunca demonstrou sintomatologia dolorosa, e o exame clínico genital, incluindo ecografia dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais anexas não evidenciou qualquer patologia, incluindo a de ampolas ocluídas. Dez éguas cobertas pelo garanhão ficaram gestantes. A concentração de testosterona sérica estava dentro dos valores normais, e os testículos tinham um desenvolvimento satisfatório (13 cm diâmetro de ambos testículos; 10 cm de largura para ambos órgãos). Em Abril de 2008, tentou-se uma técnica de colheita modificada: preparou-se uma VA do modelo Missouri, sem bainha de protecção interna e com uma temperatura interna de 60 °C (estimada a um mínimo de 55 °C na altura da colheita), e baixa pressão. Imediatamente antes da intromissão, o pénis foi coberto com uma toalha banhada em água a 60 °C, e exerceu-se pressão circular na base do pénis, em sincronia com os movimentos de intromissão. O garanhão ejaculou na primeira tentativa, com um volume do ejaculado após filtração de 170 mL, com um pH de 7 e 50% de MP. Onze dias mais tarde, no intervalo entre dois concursos, fez-se nova tentativa utilizando a mesma preparação da vagina e a técnica acima mencionada. O garanhão ejaculou de novo à primeira tentativa (volume filtrado 100 mL; pH 7,5; 55% PM). Conclui-se que este garanhão respondeu positivamente a uma temperatura interna da VA acima da temperatura máxima recomendada bem como à manipulação do pénis com toalha embebida em água com temperatura elevada. Esta modificação de preparação de VA com estimulação adicional é um método simples e barato de melhorar a função ejaculatória em garanhões.

[Use of high temperature and penis manipulation in a stallion unresponsive to standard artificial vaginas: a case report]

Increasing demands for breeding beyond feasibility by natural cover while active on the jumping circuit prompted presentation of a Holsteiner stallion for collection of semen for artificial insemination. In the past, one ejaculate had been successfully collected from this stallion, using a Missouri artificial vagina (AV) with a standard internal temperature of 45 °C to 50 °C. Despite more than 30 attempts to collect semen (2 to 5 attempts/day) over the subsequent 4 consecutive breeding seasons, only 3 ejaculates were obtained (30 to 50 mL, 77 to 109 x 10⁶ sperm/mL, 0 to 60% progressive motility [PM]). Watery/yellowish fluid was occasionally obtained, with none or a few non-motile spermatozoa. The Missouri, Colorado and Hanover models of AV were each tried, combining internal temperatures of 45 °C to 50 °C, with varying internal pressures. Mares in estrus were used as mounts. The stallion consistently displayed high arousal, good mounting and coupling, adequate insertion, and vigorous pelvic thrusting, but failed to show signs of ejaculation, even when the 3 samples with sperm were obtained. No signs of pain or discomfort were apparent. On physical and ultrasound examination, no evidence of occluded ampullae or genital abnormalities was found. The testes were well developed (paired width 13 cm; lengths 10 cm) and serum testosterone concentration was within the normal range. Ten mares served naturally by the stallion became pregnant. In April of 2008 a further collection attempt was made, using a Missouri model AV without a disposable plastic liner, and filled with 60 °C water such that the lumen temperature was approximately 55 °C when applied to the penis. To better accommodate the stallion's large glans penis flare, a low internal pressure was used. Immediately after insertion, a towel moistened with 60 °C water was applied with the hand to the base of the penis, to which circumferential pressure was exerted during each thrust. An ejaculate was collected on the first mount (170 mL gel-free, estimated > 100 x 10⁶ sperm/mL, pH 7, 50% PM). Eleven days later, using the same method, semen collection was again immediately successful (100 mL gel-free volume, 126 x 10⁶ sperm/mL, pH 7.5, and 55% PM). It is concluded that this stallion responded positively to the high AV temperature along with hot towel pressure applied to the base of the penis, lower AV internal pressure to accommodate the large glans penis flare, and a well-lubricated bare latex lumen. Modifications of AV preparation with additional stimulation is a simple and inexpensive method of enhancing ejaculatory function in stallions.

Influência da fonte proteica e sua interacção com o meio na maturação in vitro (IVM) de oócitos de cadela

Lopes, G., Ferreira, P., Rocha, A.

Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

Introdução e objectivo: Vários trabalhos analisam a melhor combinação entre fonte proteica/tipo de meio na maturação in vitro (IVM) de oócitos de cadela. O TCM199 suplementado com soro fetal bovino (FBS) ou albumina sérica bovina (BSA) são as combinações mais frequentemente utilizadas na IVM de oócitos desta espécie. Contudo, no nosso laboratório quando utilizamos TCM199/FBS5% como meio de maturação obtivemos uma elevada percentagem de oócitos degenerados após 24-48 horas de cultura. De forma a tentar perceber porque estávamos a obter este resultado realizamos a seguinte experiência. **Material e Métodos:** Os ovários de 6 cadelas, recolhidos após ovariectomia, foram sujeitos a cortes repetidos no córtex com um bisturi de forma a obter os complexos de cumulus-oócitos (COCs). Após selecção e lavagem, os COCs de Grau 1 foram distribuídos pelos seguintes meios de maturação: TCM199 suplementado com FBS 5% (N=46); TCM199 suplementado com BSA 0.3% (N=42); PBS suplementado com 5% FBS (N=38); e PBS suplementado com 0.3% BSA (N=40). Após 48 horas de incubação (T=38 °C, 5% CO₂ e atmosfera húmida) os oócitos foram desnudados, corados com Hoechst 33342 e observados ao microscópio de fluorescência para determinação da fase de maturação nuclear. Foi utilizada a seguinte classificação: a) vesícula germinal (GV) quando foram observados finos filamentos de cromatina e um nucleolo; b) roturas da vesícula germinal (GVBD) quando se observaram cromossomas condensados dispersos no ooplasma e c) metáfase I (MI) observaram-se cromossomas condensados alinhados numa placa metafásica. Oócitos com agregados de cromatina, bem como nos que não se observou nenhuma coloração fluorescente (DNA), foram considerados Degenerados. O teste de qui-quadrado foi utilizado para determinar diferenças entre grupos. **Resultados:** Após 48 horas de incubação, todos os oócitos do grupo TCM199/FBS5% (N=46) estavam degenerados. O grupo TCM199/BSA0.3% apresentou uma percentagem mais elevada (p<0.01) de reinício de meiose (GVBD e MI) (62%) do que os dois grupos de PBS (30% para BSA0.3% e 8% para FBS5%), e uma percentagem menor (p<0,01) de oócitos degenerados (31%) do que o PBS/FBS5% (61%). **Discussão:** A utilização de um meio o mais simples possível é a forma mais fiável de saber quais os compostos a que esteve sujeito o ócito. Através da utilização de um simples tampão fosfato tentamos perceber se o FBS sozinho ou em interacção com o TCM199 estava a causar degeneração dos oócitos. Esta última hipótese para ser a mais provável uma vez que 40% dos oócitos incubados em PBS suplementado com FBS5% ficaram viáveis após cultura enquanto em TCM199/FBS5% todos os oócitos degeneraram. Observou-se ainda que a combinação TCM199 suplementado com BSA0,3% foi a que resultou na maior percentagem de reinício de meiose, embora nenhum dos oócitos atingisse o estadio de metáfase II.

[Influence of protein source and its interaction with medium on the in vitro maturation (IVM) of canine oocytes]

Introduction and Aim: Several studies have focus on the best combination of protein source/medium type for in vitro maturation (IVM) of canine oocytes. TCM199 supplemented with fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) are the most common combinations for IVM mediums of canine oocytes. However, in our lab, the use of TCM199/FBS5% for IVM of canine oocytes resulted in a high incidence of degenerated oocytes after 24-48hs of culture. The following experiment was carried out with the aim of understand the reasons for this high degeneration rates. **Material & Methods:** Ovaries were obtained from 6 bitches and COCs were recovered by the slicing method. After selection and washing, Grade 1 COCs were assigned to one of the following maturation mediums: TCM 199 supplemented with 5% FBS (46 COCs); TCM 199 supplemented with 0.3% of BSA (42 COCs); PBS supplemented with 5% FBS (38 COCs) and PBS supplemented with 0.3% BSA (40 COCs). After 48 hours of incubation (38 °C, 5% CO₂ and humidified atmosphere) oocytes were mechanically denuded, stained with Hoechst 33342 and examined in a fluorescence microscope to assess nuclear maturation status. The DNA material of grade-I oocytes was classified as being at: a) germinal vesicle (GV) stage when fine chromatin filaments and a nucleolus were observed; b) germinal vesicle breakdown (GVBD) stage when condensed chromosomes appeared intermingled in the ooplasm, and c) metaphase-I (MI) stage when condensed chromosomes were aligned into a metaphase plate. Oocytes with dispersed chromosomes or chromatin aggregates, as well as those without any DNA staining, were considered Degenerated. A chi-square test was used to determine differences between groups. **Results:** At 48 hours all oocytes (N=46) from the TCM+FBS5% group were degenerate. TCM+BSA0.3% had a higher (p<0.01) percentage of meiosis resumption (62%) than both PBS groups (30% for BSA0.3% and 8% for FBS5%) and a lower (p<0.01) percentage of degenerated oocytes (31%) than group PBS+FBS5% (61%). **Discussion:** Keeping the medium as simple as possible is the most reliable manner of knowing the compounds to which oocytes have been subjected. By using a simple phosphate buffer PBS, we tried to understand if FBS alone or its interaction with TCM199 was causing oocyte degeneration. The last hypothesis seems to have been the case as PBS supplemented with 5%FBS was able to maintain 40% of the oocytes viable, of which 8% underwent meiosis resumption. Contrary all oocytes were degenerated in TCM 199/FBS5%. TCM199 supplemented with BSA0.3% was the best combination for IVM of canine oocytes in this study, despite none of the oocytes reached metaphase II.

Caracterização da produção de biofilme, da expressão de celulose e de fimbrias curli por isolados de *E. coli* recuperados de úteros de vacas leiteiras com puerpério normal ou metrite clínica

Silva, E., Leitão, S., Carneiro, C., Oliveira, M., Nunes, T., Lopes da Costa, L., Mateus, L.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Escherichia coli é a bactéria mais frequentemente isolada do útero da vaca leiteira durante a 1ª semana pós parto e está implicada na patogénese da infecção uterina puerperal. A capacidade de formação de biofilmes por *E. coli* é um factor que pode contribuir para a sua persistência nos tecidos e tolerância aos antibióticos. De igual forma, coloca-se a hipótese da formação de biofilme poder ter um papel relevante na patogenicidade e terapêutica das infecções uterinas puerperais. Neste estudo, foi avaliado o potencial de formação de biofilme por isolados de *E. coli* (n=74) recuperados de úteros de vacas leiteiras com puerpério normal ou metrite clínica. Numa fase inicial, foi testada a expressão de fimbrias curli e a produção de celulose, características usualmente associadas à formação de biofilmes. A expressão de curli e produção de celulose foi detectada em 77% e 34% dos isolados, respectivamente, quando incubados a 37 °C. À temperatura de 28 °C, 82% e 51% dos isolados expressaram curli e produziram celulose, respectivamente. O efeito da temperatura de incubação foi significativo para a produção de celulose ($p<0,05$). Apesar de nem todos os isolados expressarem fimbrias curli, nas condições testadas, dois dos genes envolvidos na sua síntese (CsgA and CsgD) foram detectados no genoma de todos os isolados. A formação de biofilme in vitro foi avaliada por densidade óptica e quantificada através do Índice Específico de Formação de Biofilme e por FISH. Demonstrou-se que a formação de biofilme é afectada quer pelo meio de cultura, quer pela temperatura. A quantidade de biofilme formada foi superior em meio rico, quando comparado com o meio mínimo ($p<0,05$), ambos sem NaCl, e à temperatura de 28 °C, quando comparada com a temperatura de 37 °C ($p<0,05$). Esta formação de biofilme esteve associada com a expressão de fimbrias curli e com a produção de celulose ($p<0,05$) em meio mínimo, mas não em meio rico, o que indica que num meio nutricional pobre, estas duas características são importantes. O tipo de puerpério (normal *versus* metrite clínica) não teve efeito significativo na expressão de fimbrias curli, na produção de celulose e na formação de biofilme. Este resultado demonstra que, embora estas características possam ser relevantes para a patogénese da doença, existem outros factores, nomeadamente a imunidade individual, determinantes para o estabelecimento da doença.

Trabalho financiado pela Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) (projecto POCTI/CVT/48773/2002); Elisabete Silva é financiada por uma bolsa de Pós-Doutoramento (BPD/35031/2007).

[Characterization of biofilm production, curli and cellulose expression by *E. coli* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis]

In the cow, *E. coli* is the most prevalent bacterium present in the uterus during the first week postpartum and is implicated in the pathogenesis of the puerperal uterine infection. The known ability of some *E. coli* strains to develop biofilms can result in enhanced persistence in the tissue and tolerance to antimicrobials. This might be of relevance in the pathogenesis and therapeutics of puerperal uterine infections, although data on this issue was not reported. In this study we report the in vitro biofilm formation potential of *E. coli* isolates (n=74) recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. Expression of curli fimbriae and production of cellulose, characteristics usually associated to biofilm formation were observed in 77% and 24% of isolates cultured at 37 °C, respectively and, in 82% and 51% of isolates cultured at 28 °C, respectively. The effect of incubation temperature was significant ($p<0.05$) for cellulose production. In vitro biofilm formation was evaluated by optical density, through the Specific Biofilm Formation index (SBF) and by FISH staining. Biofilm formation was significantly affected by culture medium, being greater in rich than in minimal medium ($p<0.05$), both without NaCl and, by incubation temperature, being greater at 28 °C than at 37 °C ($p<0.05$). Biofilm formation was significantly associated to curli fimbriae expression and cellulose production ($p<0.05$) in minimal medium but not in rich medium, which indicates that in a low nutrition level, these characteristics are relevant to biofilm formation. The curli fimbriae encoding genes were present in all isolates, indicating that differences in expression among isolates are the result of differences in gene expression, rather than differences in the genome of the bacterium. The type of puerperium (normal *versus* clinical metritis) had no significant effect on curli fimbriae expression, cellulose production and biofilm formation. This indicates that, although these *E. coli* characteristics may be relevant for the pathogenesis of the disease, other factors, namely the cow's defence mechanisms, affect the establishment of the disease.

This study was supported by FCT (Foundation for Science and Technology) (grant POCTI/CVT/48773/2002). Maria Elisabete Silva was supported by a postdoctoral fellowship (BPD/35031/2007) from FCT.

Caracterização genómica de *E. coli* isoladas de úterus de vacas leiteiras com metrites clínica e de úterus de cadelas com piómetra

Silva, E.¹, Leitão, S.¹, Tenreiro, T.², Pomba, C.¹, Lopes da Costa, L.¹, Mateus, L.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Edifício ICAT, Campus da FCUL, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

Escherichia coli é a bactéria mais prevalente no útero da vaca leiteira durante a primeira semana pós-parto, favorecendo o estabelecimento de uma infecção uterina puerperal que normalmente progride para uma metrite/endometrite que não coloca em risco a vida do animal. Na cadela, a presença de *E. coli* no útero está frequentemente associada ao desenvolvimento de piómetra, sendo responsável pelas alterações sistémicas observadas.

Neste trabalho foi efectuada uma comparação entre as características genómicas de isolados (n=72) provenientes do útero de vacas leiteiras, com puerpério normal (n=18) e metrite clínica, e as de isolados recuperados do útero de cadelas com piómetra (n=9). Com este objectivo, analisaram-se os fingerprints de DNA genómico gerados por rep-PCR (ERIC2 e REP-PCR), o agrupamento filogenético e a presença de 15 factores de virulência por PCR convencional. Detectou-se uma grande variabilidade genética entre os isolados de bovinos, com 40 tipos clonais identificados. Seis destes 40 tipos foram identificados em vacas com puerpério normal e metrite clínica, sendo os restantes 34 específicos de cada grupo. No entanto, a maioria dos tipos clonais específicos de vacas com metrite clínica foram constituídos por um único isolado ou por múltiplos isolados de um único animal, não sendo possível estabelecer uma associação entre o tipo clonal e o estabelecimento da doença.

Os isolados caninos também demonstraram uma grande variabilidade genética, verificando-se que o grau de similaridade entre os isolados de *E. coli* de canídeos e bovinos foi somente de 24,6%. Os isolados de *E. coli* de origem bovina foram na sua maioria agrupados nos grupos filogenéticos B1 (58,3%) e A (30,5%), contrariamente aos isolados de canídeos que foram todos incluídos no grupo filogenético B2. Apenas 4 dos 15 factores de virulência testados foram detectados no genoma dos isolados de canídeos. Pelo contrário, até 6 factores de virulência foram detectados num único isolado de *E. coli* de canídeo. Em conclusão, os resultados indicam que contrariamente aos isolados de *E. coli* recuperados de úterus de cadelas com piómetra, os isolados de *E. coli* provenientes de úterus de vacas durante o puerpério apresentam um baixo potencial de virulência, o que está de acordo com o agrupamento destes isolados em grupos filogenéticos não patogénicos. Isto poderá explicar, em parte, as diferenças entre a infecção uterina puerperal na vaca e a piómetra na cadela.

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (projecto POCTI/CVT/48773/2002 e PTDC/CVT/66587/2006) e pelo CIISA (projecto 74. Hiperplasia). Elisabete Silva é financiada por uma bolsa de Pós-Doutoramento (BPD/35031/2007).

[Genomic characterization of *E. coli* involved in the different outcomes of the uterine infection in the cow and in the bitch]

Why does the same bacterium, *Escherichia coli*, in the same tissue, the uterus, show such a different pathogenicity in two different species, the cow and the bitch? In the puerperal cow it favours the infection by other bacteria, usually originating a non life-threatening endometritis/metritis that may resolve spontaneously. In the bitch, in contrast, the bacterium is associated with severe systemic symptoms, originating a life-threatening pyometra. Can genetic differences in the isolates explain the different outcomes of the infection in the two species? Also, can genetic differences be related with the establishment of the infection in the puerperal cow? Here, we report the comparison of the genomic characteristics of 72 *E. coli* isolates recovered from the uterus of dairy cows with either normal puerperium or clinical metritis with those isolates recovered from the uterus of bitches with pyometra (n=9). We analyzed DNA fingerprints generated by rep-PCR (ERIC2 and REP), the phylogenetic groups and the presence of 15 virulence factor genes by conventional PCR. A great genetic diversity was detected among the bovine isolates: 40 clonal types, from which 6 types were common to cows with normal puerperium and clinical metritis and the remaining were specific from each of these groups. However, most of these clonal types were represented by a single isolate and, therefore, an association between clonal type and establishment of the disease was unclear. Canine isolates also showed a great genetic heterogeneity, but the degree of genetic similarity between the canine and bovine *E. coli* isolates was only 24.6%. Bovine *E. coli* isolates were mostly assigned to non-pathogenic phylogenetic groups B1 (58.3%) and A (30.5%), while all canine isolates were assigned to the pathogenic group B2. Only 4 VF-genes were detected in the bovine isolates, although with very different prevalences. In contrast, up to 6 VF-genes were detected in a single canine isolates. In conclusion, data presented in this paper indicate that, contrary to *E. coli* isolates recovered from the uterus of bitches with pyometra, *E. coli* isolates recovered from puerperal cows do not belong to a pathogenic group and have a low potential of virulence. This may explain, in part, the different outcomes of the uterine infection in the puerperal cow and the pyometra bitch.

This study was supported by Foundation for Science and Technology (FCT) (grants POCTI/CVT/48773/2002 and PTDC/CVT/66587/2006) and by CIISA (grant 74. Hiperplasia). Maria Elisabete Silva was supported by a postdoctoral fellowship (BPD/35031/2007) from FCT.

Vitrificação de oócitos bovinos: resultados preliminares.

Marques, C.C., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M., Barbas, J.P., Pereira, R.M.

INRB IP, L INIA, Unidade dos Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém; nvarandamarques@gmail.com

A congelação de oócitos e embriões é crucial para a manutenção e disseminação dos recursos genéticos animais. A criopreservação de oócitos bovinos serve actualmente como modelo para estudos de crioconservação de oócitos provenientes de mulheres em perigo de perda da função ovárica. Contudo, os oócitos dos mamíferos são de todas as células conhecidas as mais difíceis de congelar. Novas estratégias são necessárias para ultrapassar esta barreira. A composição dos meios de maturação e as técnicas de vitrificação podem dificultar a sobrevivência dos oócitos após descongelação. A cisteamina adicionada ao meio de maturação aumenta a concentração intracelular em glutatião, protegendo-os das alterações por oxidação. O factor de crescimento epidérmico (EGF) aumenta a síntese de DNA e a produção de proteínas pelas células do cumulus, estimulando a maturação do oócito. Este último efeito, embora controverso, é também apontado ao estradiol (E₂). Pretendeu estudar-se o efeito da suplementação do meio de maturação com cisteamina, EGF e E₂ sobre a viabilidade de oócitos bovinos descongelados após vitrificação em palhinhas superfínas (SOPS) mergulhadas em LN₂. Oócitos bovinos obtidos em matadouro foram maturados (22h) em TCM199 + 10% soro de vaca em cio superovulada (SOCS) + 10 µg mL⁻¹ FSH (matA, n=643) ou suplementado com 100 µM cisteamina, 10 ng mL⁻¹ EGF e 10 µg mL⁻¹ E₂ (matB, n=646) a 39 °C e 5% CO₂. Para a vitrificação, transferiram-se os oócitos (matA vitrif, n=155; matB vitrif, n=134) para TCM-199 + 20% FCS (BM-meio basal), depois para BM + 10% DMSO + 10% EG durante 30 s e finalmente para BM + 20% DMSO + 20% EG + 0.48 M galactose. Após descongelação, os oócitos continuaram a maturação (TCM199 + 10% SOCS) durante 2h, sendo fertilizados para determinação da viabilidade. Os oócitos frescos maturados em ambos os meios (grupo matA frescos, n=209; grupo matB frescos, n=206) serviram de controlo. Os resultados da sobrevivência dos oócitos pós-descongelação (4 sessões) foram analisados por ANOVA.

Nos oócitos frescos, a suplementação do meio de maturação (P>0,05) não interferiu nas taxas de maturação e clivagem. À descongelação, as taxas de sobrevivência (matA vitrificados =95,9±2,2% vs. matB vitrificados =94,3±2,9%) e de reexpansão (matA vitrificados =64,4±3,3% vs. matB vitrificados =61,3±4,0%) dos oócitos não apresentaram diferenças entre grupos (P>0,05). Como se esperava, as taxas de clivagem foram inferiores (P<0,0001) nos oócitos vitrificados (matA frescos =71,0±2,9%, matA vitrificados =8,7±4,3%, matB frescos =70,2±5,8% e matB vitrificados =17,2±5,8%).

Estes resultados, embora preliminares, sugerem que a cisteamina, o EGF e o E₂ adicionados ao meio de maturação não têm efeito sobre a capacidade fertilizante, desenvolvimento embrionário e crioresistência de oócitos bovinos submetidos a vitrificação.

[Bovine oocyte vitrification: preliminar results]

Cryopreservation of oocytes and embryos is crucial for the widespread and conservation of animal genetic resources. Moreover, bovine oocyte cryopreservation is a useful model for human oocytes cryostorage of patients in danger of losing their ovarian function. Nevertheless, mammalian oocytes are probably the most difficult cells to cryopreserve. Strategies are needed to overcome this challenge. Both maturation media composition and vitrification procedures may present a major setback on further survival of cryopreserved oocytes. Cysteamine in maturation medium increases the intracellular glutathione content of bovine oocytes protecting them from oxidative damages. Epidermal growth factor (EGF) enhances DNA and protein synthesis production by cumulus cells stimulating oocyte maturation. Controversially, estradiol (E₂) is referred to increase maturation rate in bovine oocytes.

We aimed to study the effect of cysteamine, EGF and E₂ supplementation to maturation medium on the viability of warmed oocytes submitted to vitrification in superfine open pulled straws (SOPS). Abattoir-derived oocytes were matured in TCM199 + 10% superovulated estrus cow serum (SOCS) + 10 µg mL⁻¹ FSH (mat A, n=643) supplemented with 100 µM cysteamine, 10 ng mL⁻¹ EGF and 10 µg mL⁻¹ E₂ (mat B, n=646) at 39 °C and 5% CO₂ for 22h. Matured oocytes (vitrified mat A, n=155; vitrified mat B, n=134) were placed in TCM-199 + 20% FCS (BM- base medium), equilibrated in BM + 10% DMSO + 10% EG for 30 s and vitrified in BM + 20% DMSO + 20% EG + 0.48 M galactose. Oocytes were loaded in SOPS and plunged into NL₂. After warming, oocytes were cultured (TCM199 + 10% SOCS) during 2h and subsequently fertilized for viability assessment with motile spermatozoa obtained by centrifugation after swim up. Fresh oocytes matured in both media (fresh mat A group, n=209; fresh mat B group, n=206) were used as controls. Data from post-thawing survival (4 sessions) were analysed using ANOVA.

In fresh oocytes, maturation medium supplementation did not influence (P>0.05) either maturation or cleavage rates. In vitrified oocytes, neither postwarming survival (vitrified mat A = 95.9±2.2% vs. vitrified mat B = 94.3±2.9%) nor postwarming expanding rates (vitrified mat A = 64.4±3.3% vs. vitrified mat B = 61.3±4.0%) were different (P>0.05) between groups. As expected, cleavage rates were lower (P<0.0001) in vitrified oocytes (fresh mat A = 71.0±2.9%, vitrified mat A = 8.7±4.3%, fresh mat B = 70.2±5.8% and vitrified mat B = 17.2±5.8%).

Preliminar results show that the addition of cysteamine, epidermal growth factor and estradiol to undefined maturation medium had no effect on fertilizability, developmental competence and cryoresistance of bovine oocytes submitted to vitrification.

A qualidade dos espermatozoides epididimários (EE) de bovino à descongelação é afectada pelo tipo de diluidor

Soares, L., Lopes, G., Ferreira, P., Rocha, A.

Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

Introdução: A criopreservação de espermatozoides epididimários de bovino é uma técnica útil para a preservação post mortem de gâmetas de animais geneticamente valiosos ou de animais vivos mas que já não conseguem cobrir, sendo ainda um modelo experimental útil para a congelação de EE de bovídeos selvagens. O AndroMedTM, um diluidor comercial para sémen de bovinos, e diluidores à base de Tris-citrato gema de ovo, têm sido utilizados para congelar EE de bovino. O presente estudo foi desenhado para comparar a eficiência do AndroMedTM e de um meio à base de Tris gema de ovo (Tris I e Tris II) usado para conservar sémen canino, na congelação de EE de bovino.

Materiais e Métodos: Testículos de 9 touros Holstein recolhidos após abate, foram transportados para o laboratório em NaCl 0,9% com antibióticos, a 20-22 °C. Após dissecação, a cauda do epidídimo foi colocada em placas de Petri, cortada repetidamente e deixada a repousar (10 min/37 °C) em 5mL de AndroMedTM ou de Tris-citrato-frutose. Após recolha do sobrenadante, avaliou-se: motilidade progressiva (MP), concentração, reacção ao teste hiposmótico (THO - solução de frutose 60mOsm), percentagem de espermatozoides vivos (Eosina-Nigrosina) e morfologia (Diff-QuickTM). As amostras foram depois centrifugadas (500 g/10 min), o sedimento re-diluído em AndroMedTM ou em TrisI e as amostras equilibradas (4h a 5 °C). Após o período de equilíbrio foi adicionado o segundo diluidor Tris II à amostra de TrisI. O sémen foi congelado em palhinhas de 0,25mL (20x106 espermatozoides móveis/palhinha) em vapor de azoto líquido (-80 a 120 °C) durante 10min, seguida de imersão no azoto líquido. Após descongelação (37 °C/30 segundos), foi avaliada a MP, THO, percentagens de espermatozoides vivos e a morfologia. O efeito do diluidor nos parâmetros de qualidade espermática foi determinado através de uma ANOVA unifactorial, seguida de um teste de Scheffé sempre que detectadas diferenças significativas (p<0,05). **Resultados:** O sémen fresco diluído em Tris apresentou uma MP maior (64%; p<0,01) do que o diluído em AndroMedTM (40,6%). Não houve diferenças (p>0,05) para os outros parâmetros. Após descongelação, as amostras congeladas em Tris tiveram maior MP (40,5%; p<0,001), maior percentagem de espermatozoides vivos (63%; p<0,001) e de formas morfolologicamente normais (50%; p<0,01), do que os congelados em AndroMedTM (respectivamente 20%, 21% e 35%). As amostras preservadas em Tris apresentaram menor percentagem de reflexo da peça intermédia (4,8%; p<0,05) e de defeitos do acrossomas (7,6%; p<0,001) do que as amostras preservadas em AndroMedTM (respectivamente 12,4% e 22,6%). **Conclusão:** O diluidor TrisI/II utilizado para sémen de cão, apresentou melhor resultados na criopreservação de EE bovinos do que o diluidor comercial AndroMedTM. As características de um diluidor podem ser benéficas para crioprotecção do sémen de espécies diferentes.

[Quality of frozen/thawed bovine epididymal spermatozoa (ES) is affected by type of extender]

Introduction: Cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa (ES) is a useful technique for post-mortem gamete preservation of genetically valuable bulls, or for bulls that are no longer able to mate. In addition, the technique is useful as an experimental model to preserve semen of endangered species of bovines. AndroMedTM and Tris-citrate-buffered egg yolk extenders have been used to freeze bull ES. In the present study, the quality of frozen-thawed bovine ES cryopreserved in either AndroMedTM or in a Tris-citrate egg-yolk extender (TrisI and TrisII) successfully used to freeze canine semen, was compared.

Materials and Methods: Testicles of 9 Holstein-Frisian bulls were collected at slaughterhouse and transported to the lab in 0.9% NaCl plus antibiotics at 20-22 °C. After dissection, epididymal tails were placed in a Petri dish, minced and allowed to rest for 10 minutes in 5mL of AndroMedTM or Tris-citrate-fructose, at 37 °C. The supernatant was collected into a FalconTM tube, and a sample was evaluated for progressive motility (PM), concentration (Newbauer chamber), reaction to the hypoosmotic swelling test (HOST - 60mOsm fructose solution), viability (Eosin-Nigrosin) and morphology (Diff-QuickTM). Samples were then centrifuged (500g; 10min) and the pellets were re-extended in AndroMedTM or TrisI extender and equilibrated for 4h at 5 °C. After equilibration, TrisII was added to the sample extended in TrisI. Semen was frozen in 0.25 mL straws (20x106 motile spermatozoa/straw) in liquid nitrogen vapor (-80 to -120 °C) for 10 min followed by immersion in liquid nitrogen. After thawing (30 sec; 37 °C), PM, HOST, viability and morphology were evaluated as previously described. Effect of extender on ES parameters was assessed using a one way ANOVA followed by a post-hoc Scheffé test whenever significant (p<0.05) differences were observed.

Results: Higher (64%; p<0.01) progressive motility was found for fresh ES extended in Tris than for ES extended in AndroMedTM (40.6%). No differences between extenders were seen for all other parameters. After thawing, ES cryopreserved in Tris extender had higher PM (40.5% vs 20.0%; p<0.001), viability (63.0% vs 21.0%; p<0.001) and morphologically normal spermatozoa (50.0% vs 35.0%; p<0.01) than AndroMedTM. In relation to type of morphological defects at thawing, samples extended in Tris had a lower percentage of spermatozoa with distal midpiece reflex (4.8%; p<0.05) and abnormal acrosome (7.6%; p<0.001) than samples extended in AndroMedTM (12.4% and 22.6%, respectively).

Conclusion: The Tris egg-yolk extender used was better suited for freezing bovine ES, than the commercial extender AndroMedTM. Semen of different species can be successfully protected from cryo-injuries by the same extender.

Utilização dos parâmetros espermáticos e da fertilização *in vitro* (FIV) para prognóstico da fertilidade *in vivo* de sêmen descongelado de caprino

Pereira, R.M.¹, Marques, C.C.¹, Barbas, J.P.¹, Baptista, M.C.¹, Poulin, N.², Vasques, M.I.¹, Mascarenhas, R.D.¹, Cogne, Y.², Cavaco-Gonçalves, S.¹, Horta, A.E.M.¹

1 INRB IP, L INIA, Unidade dos Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

2 Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380 Nouzilly, France

A aplicação de programas eficientes de inseminação artificial (IA) associada a testes de descendência e a esquemas de produção e transferência de embriões melhoram significativamente o progresso genético anual. No entanto, os resultados da IA com sêmen caprino descongelado apresentam grande variabilidade. A criopreservação induz danos irreversíveis nas membranas espermáticas tornando imperativo prever a fertilidade do sêmen descongelado previamente à IA. Pretendeu-se investigar a potencialidade de vários testes à função espermática (motilidade individual-MI, viabilidade, normalidade, endosome-HOST, FIV e produção de embriões) na previsão da fertilidade *in vivo* (TF: número de cabritos nascidos/ número de cabras inseminadas) do sêmen caprino descongelado. Sêmen de bodes (n=4) da raça Serrana foi congelado no Outono e Inverno. Após descongelação, o sêmen foi avaliado e utilizado para IVF (Outono e Inverno) ou IA cervical (n=69, sêmen de Outono) de cabras sincronizadas. Oócitos provenientes do matadouro foram maturados em TCM199, 100 µM cisteamina, 10 ng mL⁻¹ EGF, 10 µg mL⁻¹ E2 e gentamicina a 39 °C e 5% CO₂ durante 22h. Após centrifugação em gradiente de Percoll, os espermatozoides móveis foram co-incubados com os oócitos maturados (n=1245). Os presumíveis zigotos (18h p.i.) foram cultivados em fluido sintético do oviducto (SOF) com aminoácidos e BSA a 38,5 °C, com 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ até ao estágio de 2-4-8 células. Após avaliação da clivagem, o desenvolvimento embrionário prosseguiu em SOF+BSA e 10% de soro de ovelha em cio. Os resultados da FIV foram analisados usando ANOVA/MANOVA. Calcularam-se os coeficientes de correlação (n=63) entre variáveis utilizando os resultados do Outono. As variáveis com correlações significativas foram, posteriormente, testadas utilizando um modelo de regressão múltipla por stepwise.

Os resultados da IVF não variaram significativamente (P>0,05) entre estações do ano. A MI e o HOST (40 min) correlacionam-se positivamente com as taxas de clivagem e TF (MI: r=0,28, P=0,02; r=0,56, P<0,0001, respectivamente; HOST: r=0,53 e r=0,59, P<0,0001, respectivamente). As taxas de espermatozoides vivos e normais correlacionam-se positivamente com TF (r=0,40, P=0,001; r=0,28, P=0,02, respectivamente), assim como as taxas de clivagem com embriões ao 7º dia e TF (r=0,44 e r=0,70, P<0,0001, respectivamente). Pelo contrário, as anomalias da cabeça correlacionaram-se negativamente com TF (r=-0,25, P=0,04). As variáveis seleccionadas para a previsão da TF constituíram a seguinte equação: FR= -20,209+0,628 Clivagem+0,497 MI. Os presentes resultados sugerem que a taxa de clivagem *in vitro* e a MI são variáveis potencialmente importantes para o prognóstico da fertilidade do sêmen descongelado de bode previamente à IA. Contudo, a acuidade desta equação deverá ser confirmada antes da sua aplicação generalizada.

[Sperm and *in vitro* fertilization (IVF) parameters as predictors of *in vivo* fertility of frozen thawed buck semen]

An efficient artificial insemination (AI) and progeny test programs allied to embryo production and transfer schemes significantly improve annual cumulative genetic gain. However, results after AI with buck frozen-thawed semen are variable. Cryopreservation imposes irreversible damages to sperm membranes being imperative to predict the fertility of frozen-thawed semen prior to AI. We intent to investigate several sperm function tests (individual motility-IM, viability, normality, hypoosmotic swelling test-HOST, IVF and embryo production) as potential predictors of *in vivo* fertility (FR: number of born kids/number of inseminated goats) using frozen thawed buck semen. Semen from Serrana breed bucks (n=4) was frozen using a cryoprotective medium (egg yolk 6% and glycerol 6%) in Autumn and Winter. After thawing, semen was evaluated and used either for IVF (Autumn and Winter) or cervical AI (n=69; Autumn semen) of synchronized goats. Abattoir-derived oocytes were matured in TCM199, 100 µM cysteamine, 10 ng mL⁻¹ EGF, 10 µg mL⁻¹ E2 and gentamicin at 39 °C and 5% CO₂ for 22h. Motile spermatozoa were obtained by centrifugation on a Percoll gradient and co-incubated with matured oocytes (n=1245). Presumptive zygotes (18h p.i.) were cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) enriched with aminoacids and BSA at 38.5 °C, under 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ until the stage of 2-4-8 cell embryos. After assessing cleavage (48 h p.i.), embryo development proceeded in SOF+BSA and 10% estrous sheep serum. Data from IVF were analysed using ANOVA/MANOVA. Pearson's coefficients of correlation (n=63) were calculated to determine the relationship among variables using results from Autumn season. All significantly correlated variables with FR were tested for a stepwise general regression model. There were no significant differences (P>0.05) among seasons for IVF and embryo rates. IM and HOST at 40 min results were positively correlated with cleavage rate and FR (IM: r=0.28, P=0.02; r=0.56, P<0.0001, respectively; HOST: r=0.53 and r=0.59, P<0.0001, respectively). Live and normal spermatozoa were positively correlated with FR (r=0.40, P=0.001; r=0.28, P=0.02, respectively). Also cleavage rate was positively correlated with Day 7 embryo rate and FR (r=0.44 and r=0.70, P<0.0001, respectively). On the contrary, spermatozoa head abnormalities were negatively correlated with FR (r=-0.25, P=0.04). Stepwise selected variables to predict *in vivo* fertility resulted in the following equation: FR= -20.209+0.628 Cleavage+0.497 IM. The above results suggest that *in vitro* cleavage rate and spermatozoa IM can be considered important variables to be used as potential predictors of thawed buck semen fertility prior to AI. For routine use, further studies are needed to confirm the accuracy of the above equation.

Expressão das ciclo-oxigenases no endométrio da cadela durante o ciclo éstrico

Santos, C.¹, Santos, D.², Mateus, L.³, Pires, M.A.⁴, Payan-Carreira, R.⁴

1 DEBA, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 CITAB, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon

4 CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

A enzima ciclooxigenase (COX) é uma enzima controladora, que produz prostaglandinas a partir do ácido araquidónico. Esta enzima apresenta duas isoformas, COX-1 e COX-2, que intervêm em diversos processos fisiológicos mediante regulação parácrina e autócrina e demonstram uma expressão e regulação celular específica. A COX-1 é uma enzima constitutiva, que intervem na síntese de prostaglandinas (PGs) em situações fisiológicas normais, podendo a sua expressão variar em resposta a outros factores, como citoquinas ou hormonas, como é o caso dos esteróides. No útero, está demonstrado que a COX-2 desempenha um papel importante nas alterações cíclicas do endométrio, sendo igualmente essencial para a implantação e decidualização. Pelo contrário, verificou-se que a expressão de COX-1 no útero é invariável ou não detectável. Em outras espécies foi igualmente demonstrado que as ciclooxigenases evidenciam variações durante o ciclo éstrico e numa fase inicial da gestação.

O objectivo deste estudo é o de examinar a localização imuno-histoquímica e o padrão de expressão da COX-1 e COX-2 no endométrio da cadela durante o ciclo éstrico. Para todas as fases do ciclo éstrico, foram obtidas amostras de úteros, após ovariectomia, as quais foram fixas em formol 10% e parafinadas. Para a avaliação imuno-histoquímica da expressão das COX no endométrio, foram utilizadas secções de tecido com 2 µm, utilizando o método da avidina-biotina peroxidase. Para a detecção imuno-histoquímica da COX-1 utilizou-se um anticorpo policlonal (cat. no160108; Cayman Chemical Co, USA), e para a COX-2 utilizou-se um anticorpo monoclonal (clone 33; Transduction Lab, USA). A avaliação imuno-histoquímica foi feita por dois observadores independentes; os resultados foram registados em termos de intensidade [de + a +++] e de localização da marcação celular [tipo e percentagem de células marcadas]. Observou-se uma marcação difusa no estroma endometrial em todas as fases do ciclo, embora se tenha verificado uma diminuição da intensidade de marcação durante o estro e o diestro muito inicial. O epitélio endometrial também apresentou marcação para a COX-1, sendo sempre mais intensa no epitélio glandular profundo do que nas glândulas superficiais e no epitélio luminal. Observou-se ainda uma diminuição no número e na intensidade das células marcadas neste epitélio durante o estro e o diestro muito inicial; em pleno diestro, verificou-se um aumento significativo da intensidade de marcação, mas não no número de células positivas, em todos os componentes epiteliais. No endométrio da cadela, a expressão de COX-2 foi somente visualizada durante o diestro, tendo sido unicamente detectada em células do epitélio superficial e das glândulas superficiais. Os resultados deste trabalho vão de encontro a estudos feitos sobre a secreção de prostaglandinas pelo endométrio das cadelas durante o diestro.

[CycloOxygenases in the bitch endometrium at different stages of oestrous cycle]

Cyclooxygenase (COX) is a rate-limiting enzyme, which produces prostaglandins from arachidonic acid. This enzyme presents two isoforms; COX-1 and COX-2 regulate diverse physiological actions through paracrine and autocrine mediation and that demonstrate cell-specific expression and regulation. COX-1 is a constitutive enzyme, synthesizing prostaglandins (PGs) in many tissues for normal physiological function, although its expression can vary in response to other factors, like cytokines, or hormones, like the sexual steroids. In the uterus, COX-2 was proved to play important roles in cyclic endometrial changes, and was also demonstrated to be essential to implantation and decidualization. On the contrary, COX-1 expression in the uterus was showed to be invariable or undetectable. Also in other species it has been showed that cyclooxygenases evidence different expression patterns during the oestrous cycle and early pregnancy

The aim of this study was to examine immunohistochemically the location and the expression pattern of COX-1 and COX-2 in the endometrium of the bitch during the oestrous cycle. Uterine samples for all the stages of the bitch oestrous cycle, obtained at ovariectomies, were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin wax. Tissue sections with 2 µm were used for the immunohistochemistry evaluation of COX expression in the bitch endometrium, using the avidin-biotin peroxidase method. Whereas for COX-1 immunodetection a polyclonal antibody (cat. no160108; Cayman Chemical Co, USA) was used, for COX-2 we used a monoclonal antibody (clone 33; Transduction Lab, USA). Two independent observers performed a blind assessment of the immunohistochemistry; the score recorded the intensity [ranging from + to +++] and the distribution pattern of the cellular labeling [type and percentage of positive cells]. COX1 diffuse expression was recorded in the endometrial stroma at all the stages of oestrous cycle although a decrease in the staining intensity was noticed during oestrus and very early dioestrus. Endometrial epithelia also showed positive labeling for COX1, which was always more intense in deep glandular epithelium than in the superficial glands and the luminal epithelia. A decrease in the number and in the intensity of marked cells were observed in these epithelia during oestrus and very early dioestrus; in full dioestrus, a marked increase in the intensity of immunolabeling, but not in the number of positive cells, was observed in all the epithelial elements. COX2 expression in the bitch endometria was only visualised during dioestrus. COX2 expression was only detected on cells of the superficial epithelium and of the superficial glands. Results from this work support previous reports on the secretion of prostaglandins by the bitch endometrium during dioestrus.

Um novo sistema de clonagem para obtenção de antígenos recombinantes em fusão com a lipoproteína bacteriana OprI, um ligando de TLR

Basto, A.P.¹, Cunha, R.C.^{1,2}, Bastos, A.P.¹, Cartaxeiro, C.¹, Martins, C.L.¹, Leitão, A.³

1 Laboratório de Doenças Infecciosas, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisboa, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

3 Instituto de Investigação Científica Tropical, CVZ e Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisboa, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Com o propósito de explorar as propriedades adjuvantes das lipoproteínas bacterianas, foram, no passado, desenvolvidos vectores de clonagem baseados no gene da lipoproteína OprI da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* para produção de proteínas quiméricas em *Escherichia coli*. Demonstrou-se que esta lipoproteína confere propriedades adjuvantes intrínsecas aos antígenos que com ela são expressos em fusão e que permite a sua apresentação cruzada no contexto de MHC classe I por células apresentadoras de antígenos. Estudos mais recentes demonstraram que as lipoproteínas bacterianas activam receptores “toll-like” (TLR) 2 em macrófagos e células dendríticas, com consequente modulação da resposta imunitária específica, o que, em parte, estará na base das suas propriedades adjuvantes. Os vectores existentes para obtenção de antígenos em fusão com a lipoproteína OprI apresentam, contudo, importantes limitações, sobretudo devidas a deficiente repressão da expressão basal na ausência de indutor e a dificuldades na purificação dos antígenos de fusão. No presente trabalho é proposto um novo sistema de expressão que contorna estas limitações. O gene da OprI clonado no plasmídeo pVUB3 foi amplificado por PCR e inserido no local BamH I do vector pET24a(+). Desta forma obtém-se uma lipoproteína precursora expressa com uma T7-Tag N-terminal, que permite a avaliação do processamento pela sinal peptidase II, e uma cauda de histidinas C-terminal, que permite a purificação por cromatografia de afinidade com iões metálicos. Na ausência de indutor, observou-se a repressão completa da expressão utilizando a estirpe de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. Após indução por IPTG, verificou-se a presença da lipoproteína madura, bem como dos derivados de fusão OprI-antígeno, na membrana externa da bactéria hospedeira e no meio de cultura e foi possível proceder à sua purificação por cromatografia de afinidade. Os nossos resultados validam um novo sistema para a produção de antígenos recombinantes em fusão com um ligando TLR, com potencial aplicação em estudos de imunologia e na formulação de novas vacinas.

Financiamento: FCT POCI/CVT/59122/2004, SFRH/BD/23486/2005; CIISA, FMV.

[A new cloning system to obtain recombinant antigens in fusion with the bacterial lipoprotein OprI, a TLR ligand]

With the purpose to exploit adjuvant properties of bacterial lipoproteins, cloning vectors based on the *Pseudomonas aeruginosa* OprI lipoprotein were developed in the past for the production of chimeric proteins in *Escherichia coli*. It was shown that this lipoprotein confers built-in adjuvant properties to the antigens expressed in fusion and that it enables their cross-presentation in MHC class I context by antigen-presenting cells. More recently it has been demonstrated that bacterial lipoproteins activate toll-like receptors (TLR) 2 on macrophages and dendritic cells, with consequent modulation of the adaptive immune response, what, in part, explains its adjuvant properties. The actual vectors to obtain antigens in fusion with OprI lipoprotein present, however, important limitations, mainly due to deficient repression of basal expression and to difficulties on purification of fusion antigens. In the present work we propose a new expression system that surpasses these limitations. The oprI gene cloned on the pVUB3 vector was amplified by PCR and inserted in pET24a(+) resulting in the expression of a prolipoprotein with a N-terminal T7-Tag, which enables evaluation of processing by signal peptidase II, and a C-terminal histidine tail allowing purification by affinity chromatography with Ni²⁺. In the absence of induction, a complete repression of expression was observed with the *E. coli* strain Rosetta(DE3)pLysS. After induction with IPTG, mature OprI, as well as the OprI-antigen fusion derivatives, were found in the host outer membrane and in the culture medium, and were successfully purified by affinity chromatography. Our results validate a new system for the production of recombinant antigens in fusion with a TLR ligand, with the potential to be used in immunology studies and vaccine formulation.

Funding: FCT POCI/CVT/59122/2004, SFRH/BD/23486/2005; CIISA, FMV.

Envolvimento das Proteínas de Membrana de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC na aderência a células epiteliais de pulmão de bovino

Correia, I.¹, Carvalho, C.² e Ferronha, M.H.¹

¹ INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

² Mestranda, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A aderência de um agente patogénico às células do hospedeiro constitui um factor importante no estabelecimento da infecção. Em estudos anteriores, o agente causal da Peripneumonia Contagiosa dos Bovinos (PPCB), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC), foi detectado, associado à superfície livre das células do epitélio pulmonar de bovinos com lesões patognomónicas da doença. Também foi demonstrado que este *Mycoplasma* tem capacidade para aderir in vitro a células epiteliais de pulmão de bovino (1).

O objectivo do presente trabalho foi avaliar o envolvimento das proteínas de superfície da membrana de MmmSC no processo de citoaderência. Células epiteliais de pulmão de bovino (linha celular EBL) foram infectadas com a estirpe B345/93 de MmmSC, previamente submetida à acção de tripsina e proteinase K (PK), nas concentrações finais de 0,25%, 0,5% e 1% e de 0,05%, 0,1% e 0,2%, respectivamente. A aderência dos micoplasmas às células foi revelada por imunofluorescência indirecta, sendo avaliada por citometria de fluxo (CMF) e monitorizada por microscopia de fluorescência. A inibição da citoaderência foi definida como a diminuição significativa dos valores de intensidade de fluorescência média (IFM) das células EBL comparativamente aos do controlo positivo, o qual consistiu em células incubadas com a estirpe B345/93 não tratada. A viabilidade e a actividade metabólica dos micoplasmas, não tratados e tratados com tripsina (1%) e PK (0,2%), foram avaliadas pela determinação do número de unidades formadoras de colónias e pelo teste de redução do tetrazólio, respectivamente; as concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford. Pela análise dos dados obtidos por CMF, verificou-se uma diminuição significativa dos valores de IFM nas amostras de células infectadas com os micoplasmas tratados com enzimas. Esta diminuição foi mais acentuada nas amostras tratadas com 1% de tripsina e 0,2% de PK, sendo as taxas de inibição de aderência aproximadamente de 60% e 78%; a quantidade de proteínas clivadas foi de 26% ($\pm 8\%$) e 48% ($\pm 13\%$), respectivamente. Relativamente à viabilidade dos micoplasmas, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras tratadas e não tratadas. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que as enzimas actuaram apenas sobre as proteínas de superfície da membrana, e que estas são as moléculas maioritariamente implicadas no processo de aderência de MmmSC a células do epitélio pulmonar de bovino. A caracterização de adesinas proteicas de MmmSC será um passo importante para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a PPCB.

(1) M.H. Ferronha, I. Correia, A. Amaro (2004). Relatório Final do Projecto FP5 Programa: INCO2- referência ICA4-CT-2000-30015

Este trabalho foi co-financiado pelo Programa: INCO2-referência ICA4-CT-2000-30015

[Involvement of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC Membrane Proteins in the adherence to bovine lung epithelial cells]

The adherence of a pathogen to the host cells is an important factor for the establishment of the infection.

In previous studies, the etiological agent of Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC), was detected on the free surface of the epithelial cells from bovine lungs with pathognomonic lesions of the disease. It was also demonstrated that this *Mycoplasma* species has the ability to adhere in vitro to bovine lung epithelial cells (1). The aim of the present study was to evaluate the involvement of MmmSC membrane proteins in the process of cytoadherence.

Epithelial cells from bovine lung (EBL cell line) were infected with the strain B345/93 of MmmSC, previously treated with trypsin and proteinase K (PK) at final concentrations of 0.25%, 0.5% and 1% and of 0.05%, 0.1% and 0.2%, respectively. The adherence of mycoplasmas to the cells was revealed by indirect immunofluorescence, evaluated by flow cytometry (FCM) and monitored by fluorescence microscopy. Cytoadherence inhibition was defined as the significant decrease on the mean fluorescence intensity (MFI) values of the EBL cells, comparing with those of the positive control, consisting of cells infected with strain B345/93 not submitted to enzymatic treatment. The viability and metabolic activity of mycoplasmas, non-treated and treated with 1% trypsin and 0.2% PK, were evaluated by colony forming units counting and by the tetrazolium reduction test, respectively; protein concentrations were determined through the Bradford method.

Analysing data obtained by FCM, a significant decrease of the MFI mean values in samples of cells infected with mycoplasmas treated with enzymes was found. This decrease was more evident in those samples treated with 1% trypsin and 0.2% PK, being the cytoadherence inhibition rates of approximately 60% and 78%; the amount of cleaved proteins was 26% ($\pm 8\%$) and 48% ($\pm 13\%$), respectively. As far as viability of mycoplasmas are concerned, no significant differences were found between treated and non-treated samples. Through the results obtained, it was concluded that the enzymes acted only on the membrane surface proteins, and that these molecules are of major importance in the process of MmmSC adherence to bovine lung epithelial cells. The characterization of MmmSC proteinaceous adhesins should be an important step in the development of more efficacious vaccines against CBPP.

(1) M.H. Ferronha, I. Correia, A. Amaro (2004). Final Report of the Project FP5 Programme: INCO2- reference ICA4-CT-2000-30015

This work was co-financed by the Programme INCO2- reference ICA4-CT-2000-30015

Utilidade da genotipagem pelos MIRU-VNTR em isolados Portugueses de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*

Duarte, E.L.¹, Amado, A.², Botelho, A.²

1 Laboratório de Sanidade Anima/ ICAM, Universidade de Évora Polo da Mitra, Valverde, Évora

2 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

A utilidade da genotipagem utilizando a técnica MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats) em isolados de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*, tem sido avaliada em vários países e diversos cenários epidemiológicos. Contudo, derivado das diferentes diversidades alélicas de cada locus em diferentes países, a escolha de um painel consensual de loci para esta técnica ainda não foi oficialmente adoptado. Com este trabalho, pretendeu-se contribuir com mais informação acerca dos loci mais discriminatórios para a sua utilização na genotipagem. Para este efeito, 139 isolados de *M. bovis* foram seleccionados a partir de um conjunto de estirpes previamente caracterizadas por spoligotyping (Cf. Duarte *et al.*, Vet. Microbiol. 130 (2008), 415-421) e pertencentes aos grupos predominantes no nosso país (SB0121, SB0119 e SB0886) e de entre o grupo SB0140, muito frequente no Reino Unido e Irlanda. Adicionalmente, dez isolados *Mycobacterium caprae* (SB0157) foram também incluídos neste estudo. A análise dos polimorfismos dos MIRU-VNTR foi avaliada em oito loci (VNTR3232, QUB11a, ETR-B, ETR-A, ETR-C, QUB11b, MIRU26 e MIRU 4) obtendo-se 73 perfis diferentes (índice discriminatório; h= 0.98). Os loci VNTR3232, QUB11a, ETR-B e ETR-A foram os mais discriminatórios (h=0.97). Cada grupo definido pela técnica do spoligotyping foi dividido entre sete a 44 perfis de MIRU-VNTR. Os isolados *Mycobacterium caprae* foram diferenciados em quatro perfis diferentes. Comparativamente com outros países, estes resultados indicam uma elevada diversidade genética das estirpes Portuguesas implicadas na tuberculose animal. A genotipagem recorrendo aos MIRU-VNTR é uma técnica superior para avaliar a existência de efectivos infectados com estirpes diferentes. A utilização de ambas as técnicas de genotipagem (spoligotyping e MIRU-VNTR) em conjunto com os dados relativos à proveniência geográfica dos animais permitiu confirmar a transmissão de *M. bovis* entre bovinos e espécies silvestres em duas regiões, constituindo as primeiras evidências da transmissão da infecção entre diferentes espécies no nosso país. No futuro, a utilização da genotipagem permitirá confirmar suspeitas de transmissão entre efectivos, descobrir fontes de infecção não justificadas pelas inquéritos epidemiológicos ou ainda, elucidar o eventual papel da fauna silvestre na persistência de focos de tuberculose no nosso país.

[MIRU-VNTR typing value for *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* Portuguese isolates]

The value of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR) as a genotyping technique for *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*, has been confirmed in different countries and epidemiological scenarios. However, a standardized panel of loci has not yet been adopted for these species, since allelic diversity of each locus differs among countries. In order to contribute to reach a general consensus of the most informative loci a panel of 139 *Mycobacterium bovis* strains was created by selection among the three predominant spoligotyping groups (SB0121, SB0119 and SB0886) previously found in *Mycobacterium bovis* Portuguese isolates and among the spoligotyping group SB0140, prevalent in UK and in the Republic of Ireland and also detected in Portugal (Cf. Duarte *et al.*, Vet. Microbiol. 130 (2008), 415-421). Ten *Mycobacterium caprae* strains, all SB0157, were also included in the panel. MIRU-VNTR analysis of these strains, targeting eight selected loci (VNTR3232, QUB11a, ETR-B, ETR-A, ETR-C, QUB11b, MIRU26 and MIRU 4) produced 73 different profiles (h= 0.98). Loci VNTR3232, QUB11a, ETR-B and ETR-A were found to be the most discriminatory (h=0.97). Each *Mycobacterium bovis* spoligotyping group was differentiated into seven up to 44 different MIRU-VNTR profiles. *Mycobacterium caprae* SB0157 group was differentiated into four profiles. These results support the high genetic diversity of Portuguese strains compared with other countries. MIRU-VNTR typing was superior to spoligotyping to track down herds infected with multiple strains. The combination of spoligotyping/ MIRU-VNTR typing and data from animals geographical provenance was able to confirm *M. bovis* transmission between cattle and wildlife, constituting the first molecular evidences of inter-species transmission in Portugal. Genotyping is expected, in the future, to be a valuable tool to confirm inter-herd transmission suspicions, to track down unsuspected infection sources that are not obvious in contact tracing data and to clarify wildlife role in bovine tuberculosis maintenance in our country.

Detecção de *Prototheca zopfii* e *Prototheca wickerhamii* por Hibridação In Situ Fluorescente (FISH)

Oliveira, M.¹, Cuc, C.², Rocha Dias, F.³, Răpuntean, G.², Răpuntean, S.², Bexiga, R.¹, Vilela, C.L.¹

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine 3-5, Mănăştur Street, 400372, Cluj-Napoca, Romania

³ Escola de Tecnologia e Gestão Industrial, AESBUC, Sintra

Prototheca são algas sem clorofila, unicelulares, de distribuição universal, tendo já sido isoladas a partir várias espécies animais, como porcos, ratos, bovinos, cães e gatos e suas excreções, nomeadamente leite e fezes.

São conhecidas 5 espécies de *Prototheca*, apesar de apenas *P. wickerhamii* e *P. zopfii* serem consideradas patogénicas. Em animais de companhia podem provocar manifestações cutâneas, oculares e entéricas. Em bovinos leiteiros podem provocar mastite subclínica crónica, resistente ao tratamento com antibióticos ou, menos frequentemente, casos de mastite clínica.

Para além de resistentes a antibióticos, estes microrganismos apresentam ainda um elevado grau de resistência a condições ambientais extremas. Já foram isolados entre pH 3 e 11, e o tratamento com cloro de água contaminada por *Prototheca* spp. tem efeito variável sobre as várias estirpes do agente. Também a pasteurização nem sempre é eficaz no seu controlo.

A detecção rápida de *Prototheca* é importante para o estabelecimento de medidas de controlo atempadas. Embora já se encontrem desenvolvidos testes serológicos para detecção de anticorpos específicos para *P. zopfii* no leite e no sangue, o isolamento continua a ser o método mais utilizado para evidenciar *Prototheca*. Assim, o desenvolvimento de protocolos que permitam a detecção rápida de *Prototheca* em amostras clínicas é extremamente relevante.

A Hibridação In Situ Fluorescente (FISH) é uma técnica rápida e específica, baseada na aplicação de sondas oligonucleotídicas marcadas fluorescentemente e dirigidas para o RNA ribossomal (rRNA). O objectivo deste estudo foi o desenvolvimento de um protocolo de FISH para a detecção rápida de *Prototheca*, recorrendo a uma estirpe de referência de *P. wickerhamii* (ATCC 16529) e a 6 isolados mastíticos de *P. zopfii* pertencentes a uma colecção do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Cluj Napoca (Roménia). Após crescimento em Sabouraud Dextrose Broth (24h, 37 °C), as suspensões foram colocadas em lâminas de microscopia revestidas a Teflon, fixadas com paraformaldeído a 4% (2h, temperatura ambiente), permeabilizadas com celulase β 1.4 a 3,6 mg/ml (3h, 60 °C), hibridadas com a sonda eucariota EUK 516 (3h, 46 °C), lavadas, montadas em Vectashield Mounting Medium e visualizadas por microscopia de fluorescência.

Observou-se que a acção da celulase β 1.4 permite a permeabilização da parede celular da *Prototheca*, o acesso da sonda fluorescente ao rRNA e a visualização directa de células de alga fluorescentes nas suspensões em Sabouraud Broth.

Este protocolo deverá ser optimizado para permitir a sua aplicação ao diagnóstico rápido da prototecose humana e animal. A identificação rápida e fiável de *P. zopfii* e de *P. wickerhamii* é importante para o diagnóstico e consequente estabelecimento de medidas de controlo adequadas.

[*Prototheca zopfii* and *Prototheca wickerhamii* detection by Florescent In Situ Hybridization (FISH)]

Prototheca are achlorophyllic unicellular algae with worldwide distribution, already isolated from several animal species, such as pigs, mice, cows, dogs and cats, and also from milk and feces.

Although there 5 species of the genus *Prototheca* have been described, only *P. wickerhamii* and *P. zopfii* are recognized pathogens. In domestic animals they cause skin, ocular and enteric infections. In dairy cattle, they have been isolated from subclinical mastitis, resistant to antibiotherapy, or, less frequently, clinical mastitis.

Besides resistant to antibiotics, these microorganisms are also highly resistant to adverse environmental conditions. *Prototheca* has already been isolated from environments with pH 3 and 11, and the treatment of contaminated water with chloride has a variable effect upon different *Prototheca* strains. Pasteurization is not always effective in controlling *Prototheca*. *Prototheca* rapid detection is important for the design of adequate control measures. Although serologic tests are available for the detection of antibodies against *P. zopfii* in milk and blood, isolation is still the most common method for *Prototheca* detection. Therefore, the development of protocol for the rapid detection of *Prototheca* in clinical samples is extremely relevant.

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) is a rapid and specific detection technique, based on the use of fluorescent oligonucleotidic probes specific for the ribosomal RNA (rRNA). The purpose of this study was the development of a FISH protocol for *Prototheca* detection, using a *P. wickerhamii* reference strain (ATCC 16529) and 6 *P. zopfii* mastitis isolates belonging to a collection of the Microbiology Department from the Faculty of Veterinary Medicine of Cluj Napoca (Romania). After culture in Sabouraud Dextrose Broth (24h, 37 °C), algal suspensions were placed in Teflon microscopic slides, fixed with 4% paraformaldehyde (2h, room temperature), permeabilized with cellulase β 1.4 (3,6 mg/ml, 3h, 60 °C), hybridized with the eukaryotic probe EUK 516 (3h, 46 °C), washed, mounted in Vectashield Mounting Medium and visualized by fluorescent microscopy.

The use of cellulase β 1.4 allowed for the *Prototheca* cell wall permeabilization, the access to the rRNA by the fluorescent probe and the direct visualization of fluorescent algal cells in Sabouraud Broth suspensions.

This protocol must be optimized, aiming at the diagnosis of human and animal protothecosis. The rapid and reliable identification of *P. zopfii* and *P. wickerhamii* is extremely important for its identification and for the establishment of adequate therapeutic measures.

Caracterização de estirpes de *Escherichia coli* isoladas em leitões

Anastacio, S.F., Cardoso, A., Carolino, M.I., Cannas Da Silva, J.

Laboratório de Medicina Veterinária, Lugar da Sorrateira – Atalaia, 2005-110 Almoester – Santarém;
sofia.anastacio@gmail.com, T 00351 243 491 797, F 00351 243 491 277

Neste trabalho foi efectuada a serotipificação e avaliada a síntese de hemolisinas das 44 estirpes de *Escherichia coli* isoladas em leitões, entre Janeiro de 2007 e Junho de 2008, recorrendo a métodos de bacteriologia clássicos. Verificámos que todas as estirpes foram tipificáveis pertencendo aos serótipos O141K85ab (69,8%), O139K82 (11,6%) e O138K81 (9,3%). Verificámos ainda em 9,3% das estirpes tipificáveis uma aglutinação com soro anti-adesina K88. No que respeita à pesquisa de hemolisinas verificámos uma hemólise do tipo β em 51,2% das estirpes isoladas, sendo que esta hemólise se verificou em 100% das estirpes O139K82, 50% das estirpes O138K81, 40% das estirpes O141K85ab e em 75% das estirpes com factor de adesão K88.

Estes são os resultados iniciais de um estudo de caracterização das estirpes de *E. coli* isoladas no nosso laboratório.

[Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from piglets]

In this study, 44 *Escherichia coli* strains isolated from piglets, between January 2007 and June 2008, were serotyped and evaluated to detect haemolytic activity. We observed that all of the strains were typeable belonging to serotypes O141K85ab (69,8%), O139K82 (11,6%) and O138K81 (9,3%). We also found that 9,3% of the strains were K88 positive. Concerning the haemolytic activity, we observed the presence of a β – haemolysis in 51,2% of the isolated strains and this haemolysis was detected in 100% of O139K82 strains, 50% of O138K81 strains, 40% of O141K85ab strains and 75% of K88 strains. These were the initial results of the characterization study among *E.coli* strains isolated in our laboratory.

Contaminantes fúngicos das culturas de dermatófitos provenientes de animais de companhia

Almeida, I.¹, Martins, H.², Lança, A.³, Guerra, M.^{1,3} e Bernardo, F.^{3,4}

1 Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril,

2 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

4 Direcção Geral de Veterinária

Quando se utilizam procedimentos de diagnóstico micológico de dermatófitos surgem, com relativa frequência, outros fungos que, ao desenvolverem-se no mesmo meio de cultura, acabam por interferir com a sensibilidade do método. Ao avaliar a frequência com que surgem estes contaminantes nas culturas de isolamento de dermatófitos, nos últimos três anos (2005-2007), constata-se que existe um conjunto de espécies fúngicas que surgem com certa constância. Num total de 1439 análises micológicas, usando Mycosel Agar (BD Diagnostics 211462) e DTM Mycoderme Oassay (BIO 2), encontram-se 965 situações de contaminação dessas culturas com fungos saprófitas. Os fungos de maior frequência foram *Cladosporium* spp. (28,5%), *Penicillium* spp. (15,3%), *Alternaria* spp. (15,2%), *Aspergillus* spp. (11,7%), *Malassezia pachydermatis* (8,9%), *Candida* spp. (6,7%) *Phoma* spp. (3,5%), *Chrysosporium* spp. e *Trichosporon cutaneum* (2,5%), *Rhizopus nigricans* (2,3%), *Scopulariopsis* spp. (1,0%), *Trichoderma* spp. (0,7%), *Fusarium* spp. e *Saccharomyces* spp. (0,5%). A interferência destes fungos com o desempenho da técnica de diagnóstico micológico levanta questões muito preocupantes, na medida que, pelo facto de estes contaminantes se desenvolverem mais rapidamente do que as colónias de dermatófitos acabam por prejudicar o diagnóstico. Também o significado clínico destes achados não estão totalmente elucidados, sendo certo que todos estes fungos são geralmente reconhecidos como potencial sensibilizante (alergenos).

[Cutaneous mycobiota, other than dermatophytes, found in pet]

Utilizing different diagnostics devices for mycological examination of pet' ringworm, clinicians and laboratory technicians are confronted with occurrence of many saprophytes fungi contamination. These contaminants interfere with the isolation and detection of the specific dermatophytes. Collecting data from dermatophytes's mycological examinations conducted in the last three years (2005-2007), a certain number of fungi species seems to emerge quite regularly. In a total of 1439 mycological analyses, using Mycosel Agar (BD Diagnostics 211462) and DTM Mycoderme Oassay (BIO 2) it was found that in 965 samples the cultures were contaminated with those saprophytes fungi. The most prevalent contaminants were: *Cladosporium* spp. (28.5%), *Penicillium* spp. (15.3%), *Alternaria* spp. (15.2%), *Aspergillus* spp. (11.7%), *Malassezia pachydermatis* (8.9%), *Candida* spp. (6.7%), *Phoma* spp. (3.5%), *Chrysosporium* spp and *Trichosporon cutaneum* (2.5%), *Rhizopus nigricans* (2.3%), *Scopulariopsis* spp. (1.0%), *Trichoderma* spp. (0.7%), *Fusarium* spp. and *Saccharomyces* spp (0.5%). The interference of these fungi in the mycological diagnostic is a major concern regarding their faster growth when compared with dermatophytes. Also the clinical meaning of these findings is not completely clear, despite some of the mould being generally described has having a sensitization activity potential (allergens).

Fungos e micotoxinas em grãos de aveia usada na alimentação animal

Almeida, I.¹, Martins, H.², Guerra, M.^{1,3} e Bernardo, F.^{3,4}

1 Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

2 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfca, 701, 1549-011 Lisboa

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

4 Direcção Geral de Veterinária

Os cereais estão sujeitos a contaminações e ao desenvolvimento fúngico quer durante o seu crescimento no campo quer após a colheita. Os fungos que mais frequentemente se desenvolvem no terreno são as espécies pertencentes aos género *Fusarium* as quais colonizam as palhas e os grãos antes da colheita dos cereais. Degradam os cereais, diminuem a sua qualidade e, por vezes, produzem micotoxinas. Com este estudo pretendeu-se caracterizar a eventual contaminação fúngica e a ocorrência de deoxinivalenol (DON), aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs) e ochratoxina A (OTA) em grãos de aveia. Para tal, analisaram-se quarenta e cinco amostras de aveia em grão que foram adquiridas em vários mercados de Lisboa, Portugal. Detectaram-se fungos com capacidade de desenvolvimento em Dicloran 18% Glicerol Agar (CM 0729, Oxoid) em todas as amostras. Os níveis desta contaminação variaram entre 2,6 log₁₀ ufc/g e 5,3 log₁₀ ufc/g. O género mais prevalente foi *Aspergillus* spp. (100,0%), seguido do género *Penicillium* (48,8%) e *Fusarium* spp. (44,4%). *Aspergillus glaucus* foi a espécie mais prevalente (84,4%), seguida de *Aspergillus flavus* (71,1%), *Aspergillus ochraceus* (71,1%) e *Aspergillus niger* (55,5%). O nível de contaminação de *Aspergillus flavus* variou entre 2,0 e 4,8 log₁₀ ufc/g. Os níveis de contaminação mais elevados estiveram associados a *Aspergillus glaucus* com 5,4 log₁₀ ufc/g. *Fusarium* spp. foi detectado nos níveis mais baixos (2,1 log₁₀ ufc/g). Também foram isoladas leveduras em 31,0% das amostras em teores médios de 1,6 log₁₀ ufc/g. No que se refere a micotoxinas, deoxinivalenol foi detectado em 2 amostras (4,5%) com níveis entre 309,5 e 715,4 µg/kg. Nenhuma das amostras revelou a presença de aflatoxinas nem de fumonisinas. OTA foi detectada em 9 amostras (20,0%), oscilando entre 1,00 e 1,61 µg/kg. Todas as mostras contaminadas com DON ou OTA apresentaram níveis inferiores ao limite máximo admitido. Estes resultados confirmam a necessidade de uma monitorização permanente ao longo da cadeia alimentar, incluindo as práticas culturais da produção primária, como pré-requisito em sistemas HACCP.

[Fungi and mycotoxins in unprocessed oats grains for animal feed use]

While growing in the fields, and after harvest, cereals are exposed to fungi contamination and its eventual growth. The most frequent “field fungi” are *Fusarium* species, which can colonise the straw, grain and ear before the harvest. They spoil cereals, decrease its quality and sometimes they are able to produce mycotoxins. The aim of this study was to characterize the mycobiota and the occurrence of deoxynivalenol (DON), aflatoxins (AFs), fumonisins (FBs) and ochratoxin A (OTA) on oats grains. Forty five samples of oats grains were collected from markets in Lisbon, Portugal. Fungi able to grow on Dichloran 18% Glycerol Agar (CM 0729, Oxoid) were found in all samples. The levels of its contamination ranged from 2.6 log₁₀ cfu/g to 5.3 log₁₀ cfu/g. *Aspergillus* spp was the most prevalent genera (100.0%), followed by *Penicillium* (48.8%) and *Fusarium* spp.(44.4%). *Aspergillus glaucus* was the most prevalent species (84.4%), followed by *Aspergillus flavus* (71.1%), *Aspergillus ochraceus* (71.1%) and *Aspergillus niger* (55.5%). The level of *Aspergillus flavus* contamination ranged from 2.0 to 4.8 log₁₀ cfu/g. The higher levels of contaminations belonged to *Aspergillus glaucus* with 5.4 log₁₀ cfu/g. *Fusarium* spp. was always present in lower levels (2.1 log₁₀ cfu/g). Yeasts were also present in 31.0% of the samples with a mean level of the 1.6 log₁₀ cfu/g. Deoxynivalenol was detected only in 2 samples (4.5%) with levels 309.5 and 715.4 µg/kg. None of the 45 samples revealed to be contaminated with aflatoxins, and fumonisins. OTA was detected in 9 samples (20.0%), ranging from 1.00 to 1.61 µg/kg. All contaminated samples with DON or OTA were under the limit officially admitted. These results confirm the need for a permanent monitoring of crops across the feed chain, including primary agriculture practices, as a pre-requisite of HACCP systems.

Aspergilose em Pinguins do cabo em cativeiro (*Spheniscus demersus*). Estudo de caso

Martins, H.M.¹, Monteiro, M.¹, Carvalho, P.¹, Mendonça, P.¹, Sogorb, A.², Fernandes, T.²

1 INRB IP, LNIV – Serviço de Patologia e Micologia, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

2 Jardim Zoológico e de Aclimação em Portugal, S.A., Estrada de Benfica, 158, 1549-004 Lisboa; baiagolf@zoolisboa.pt; teresalf@zoolisboa.pt

A aspergilose é uma causa de grande preocupação quando se trabalha com pinguins em parques zoológicos. É a mais importante causa de morte em instalações fechadas. *Aspergillus fumigatus* é um fungo ubiqüitário oportunista, que geralmente não causa doença. Este fungo patogénico pode ser encontrado como contaminante de alimentos, de palha e de madeiras em decomposição. O seu crescimento é promovido em ambientes húmidos e a formação de esporos possibilita a sobrevivência em condições adversas. Os ambientes com pouca ventilação aumentam o risco de infecção. Entre outras, os pinguins são as aves mais susceptíveis à aspergilose (Ritchie *et al*).

Como factores predisponentes citam-se o transporte, as doenças concorrentes, animais neonatos ou geriátricos, sobrepopulação, terapêutica imunossupressora, má ventilação, malnutrição e antibioterapia prolongada (tetraciclina). A aspergilose pode ser crónica e insidiosa ou pode causar morte hiperaguda. Infecções estabelecidas de aspergilose são difíceis de resolver clinicamente.

Os autores descrevem quatro casos fatais de aspergilose pulmonar, em pinguins do cabo, *Spheniscus demersus*, do Jardim Zoológico. Atribui-se a infecção a ninhos em ambiente sombrio e húmido. Os animais foram submetidos a necrópsia, tendo-se detectado extensas lesões de aerossaculite e poliserosite. *Aspergillus fumigatus* foi confirmado, através de cultura e exames histopatológicos como o responsável pelas lesões observadas.

[Aspergillosis in captive Jackass penguins (*Spheniscus demersus*) in captivity. Case report]

Aspergillosis is a major concern when managing penguins in zoological parks. It is the most important cause of mortality in indoor exhibits. *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic ubiquitous fungus, usually not causing disease. This organism may be found as a contaminant of animal food, straw or decaying wood and its growth is promoted by moist environments, whereas spore formation allows survival under harsh conditions. Indoor enclosures and poor ventilation increase the risk of infection. Among others, penguins are the most susceptible birds to aspergillosis (Ritchie *et al*).

Factors predisposing to an increased risk of aspergillosis include shipping, concurrent disease, neonate and geriatric animals, overcrowding, immunosuppressive therapeutics, poor ventilation, malnutrition, or prolonged antibiotic therapy (tetracyclines). Aspergillosis may be chronic and insidious or it may cause peracute death. Established aspergillosis infections are clinically challenging to resolve.

The authors describe four cases of fatal pulmonary aspergillosis in captive Jackass penguins, *Spheniscus demersus*, at Lisbon Zoo. The infection was attributed to the nests in the shade and humid environment. The animals were submitted to necropsy, and airsacculitis and poliserositis were the main lesions observed. *Aspergillus fumigatus* was confirmed as responsible for the lesions observed by cultural and histopathological examinations.

Análise proteómica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro isoladas de gaivotas das ilhas Berlengas em Portugal

Pinto, L.^{1,2,3,4}, Radhouani, H.^{1,2,3,4}, Coelho, C.^{1,2,3,4}, Ruiz-Larrea, F.⁵, Carvalho, C.^{1,2}, Torres, C.⁵, Domingues, P.⁶, Vitorino, R.⁶, Poeta, P.^{3,4}, Igrejas, G.^{1,2}

1 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 2 Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 3 Centro de Estudo de Ciências Animais e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 4 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 5 Area de Bioquímica e Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño; 6 Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro

A “Revolução Ómica” na pesquisa das bases moleculares da vida faz parte da compreensão e dos avanços na identificação de genes (genómica), proteínas (proteómica) e metabolitos (metabolómica) com aplicação em domínios tão diversos como o desenvolvimento de novos medicamentos. A Proteómica tem um papel crucial na elucidação do papel funcional dos genes e dos seus produtos, assim como na compreensão do envolvimento das proteínas nos processos celulares específicos. A electroforese bidimensional (2D) aliada à sequenciação de aminoácidos por espectrometria de massa assume, desta forma, um carácter fundamental no reconhecimento da informação proteica.

Neste estudo, foram analisadas estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLLE) a partir de amostras fecais de gaivotas (*Larus cachinnans*) das Ilhas Berlengas.

Após a extracção e solubilização proteica das estirpes bacterianas, as amostras foram submetidas a electroforese do tipo IEF (focalização isoeléctrica) em *strips* IPG de pH 3-10NL e, posteriormente, a uma segunda dimensão realizada em géis de SDS-PAGE a 12,52%.

Os géis 2D foram, finalmente, corados com Coomassie G-250 realizando-se, de seguida, a análise de imagem com recurso ao software Melanie 5.0 para possibilitar a correcta catalogação dos spots proteicos. Foi efectuada uma recolha manual individualizada destes para posterior digestão por acção da tripsina e sequenciação através de MALDI-TOF.

Após a sequenciação dos aminoácidos em cada spot e comparando os dados obtidos com os presentes nas bases de dados bioinformáticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi possível determinar, especificamente, quais os péptidos presentes e o intervalo de confiança do score proteico que foi, em todos os casos, superior a 95%. Identificou-se um total de 87 spots sendo a sua totalidade relacionada com accessions de *E. coli*. Destaca-se a accession Q7AFV7, designada de “Curved DNA-binding protein” (Massa Molecular 34367.699 e pI 6.27) referenciada ao nível da sequência genómica da estirpe enterohemorrágica *Escherichia coli* O157:H7 e a accession P62593 (Massa Molecular 31495,2 e pI 5,69) relacionada com a sequência nucleotídica do gene da resistência à ampicilina em *E. coli* produtora de BLLE. A presença de uma estirpe de *E. coli* potencialmente enterohemorrágica (EHEC) produtora de BLLE representa um sério problema de saúde pública animal e humana na medida em que é causa de diarreia aquosa inicial que pode progredir em colite hemorrágica e síndrome urémico-hemolítico. Para além deste facto, condiciona o tratamento terapêutico pelo uso de antibióticos β -lactâmicos. A anotação completa do proteoma desta estirpe bacteriana isolada de gaivotas das Ilhas Berlengas permitirá, pela primeira vez, um maior conhecimento dos níveis de resistência bacteriana entre um dos principais grupos de aves que habitam estas ilhas.

[Proteomic analysis applied to extended-spectrum β -lactamases *Escherichia coli* strains of yellow-legged seagulls from Berlengas islands of Portugal]

The "Omic Revolution" in the research of molecular bases of the life is part of the understanding and of the progresses in the identification of genes (genomics), proteins (proteomics) and metabolites (metabolomics) with application in different domains such as developing of new drugs. Proteomics as a very important part on knowing the genes function and their products, as well as understanding the proteins involvement in specific cellular processes. Therefore, bidimensional electrophoresis (2DE) combined with aminoacid sequencing by mass spectrometry has a fundamental role in processing protein information.

In this study, samples of extended spectrum β -lactamase *Escherichia coli* were isolated from faecal samples of Yellow-legged gulls (*Larus cachinnans*) from Berlengas Islands.

Subsequently to extraction and protein solubilization of the bacterial strains, samples were submitted do IEF electrophoresis (isoelectric focusing) in IPG strips pH 3-10NL and afterwards to a second dimension obtained in SDS-PAGE gels at 12.52%. 2D gels were then stained in Coomassie G-250 with posterior image analysis supported by Melanie 5.0 software for suitable protein spots cataloguing. A manual and individualized protein spots collection was conducted for later trypsin digestion and MALDI-TOF sequencing.

After aminoacid sequencing of each spot and comparing the obtained data with bioinformatics databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) it was possible to determine the specific peptides present, with a protein score confidence interval always above 95%. A total of 87 spots were identified and related to accessions of *E. coli*. Foreground to accession Q7AFV7, named “Curved DNA-binding protein” (Molecular Weight 34367.699 and pI 6.27) referenced in enterohemorrhagic strain *Escherichia coli* O157:H7 genomic sequence and accession P62593 (Molecular weight 31495.2 and pI 5.69) with the ESBL, related to the ampicilin-resistance gene's nucleotidic sequence. The presence of a potentially enterohemorrhagic (EHEC) ESBL-producing *E. coli* strain represents a serious public health problem for human and animals, because it resides as a cause for initial aqueous diarrhea which may progress into hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. In addition, it limits therapeutic treatment by β -lactamic antibiotics use.

The complete proteome annotation of this bacterial strain isolated from Yellow-legged gulls from Berlengas Islands will allow, for the first time, a greater knowledge on the bacterial resistance rate into one of the main class of birds living in these islands.

Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antibióticos em estirpes de enterococos isoladas de amostras fecais de gaivotas (*Larus cachinnans*) da reserva natural das Ilhas Berlengas em Portugal

Radhouani, H.^{1,2,3,4}, Pinto, L.^{1,2,3,4}, Coelho, C.^{1,2,3,4}, Rodrigues, J.^{2,3}, Torres, C.⁵, Igrejas, G.^{3,4}, Poeta, P.^{1,2*}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 2 Centro de Estudo de Ciências Animais e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 3 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 4 Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; 5 Universidad de La Rioja, Logroño

Objectivo: Caracterização fenotípica e genotípica da resistência antimicrobiana em enterococos isolados de amostras fecais de gaivotas da reserva natural das Ilhas Berlengas, em Portugal. **Material e métodos:** Em Setembro de 2007, foram recolhidas aleatoriamente, 54 amostras fecais de gaivotas do solo na reserva natural das Berlengas. As amostras foram semeadas em Slanetz Bartley tendo-se isolado uma colónia por amostra. Os enterococos foram testados para a resistência a 11 antibióticos através do método de difusão em disco, de acordo com as normas do CLSI. A identificação dos isolados com genes de resistência foi efectuada por métodos bioquímicos e confirmada por métodos moleculares. Por outro lado, a PCR com primers específicos foi aplicada na detecção dos genes codificadores da resistência aos diferentes antibióticos estudados. **Resultados:** 70% dos isolados apresentaram resistência a um ou mais antibióticos sendo identificados ao nível da espécie. *Enterococcus faecium* foi a mais prevalente (52,5%), seguida por *E. faecalis* (10%) e *E. hirae* (7,5%). É importante referir a relativa baixa prevalência da espécie *E. durans* (1,5%). Foram encontradas elevadas percentagens de resistência à eritromicina e tetraciclina (95%) sendo identificadas percentagens mais baixas de resistência para a quinupristina-dalfopristina, canamicina, estreptomicina e ampicilina (30%, 22,5%, 17,5% e 15%, respectivamente), cloranfenicol e ciprofloxacina (12,5%). Neste estudo, não se detectaram quaisquer isolados resistentes à gentamicina, teicoplanina ou vancomicina. Trinta e oito enterococos apresentaram resistência à tetraciclina sendo detectados os seguintes genes: *tet(M)+ tet(L)* (20 isolados) e *tet(L)* (10 isolados). Oito isolados não apresentaram nenhum dos genes *tet* testados. Os transposões *Tn916/Tn1545* e/ou *Tn5387* e o gene *erm(B)* foram detectados na maioria dos isolados resistentes à tetraciclina e eritromicina, respectivamente. Os genes *vat(D)* e *vat(E)* foram detectados em 8,3% e 16,7% dos isolados resistentes à quinupristina/dalfopristina, respectivamente. O gene *ant(6)-Ia* foi observado em 57,1% dos isolados resistentes à estreptomicina e sete dos nove isolados resistentes à canamicina possuíam o gene *aph(3)-IIIa*. O gene *cat(A)* foi encontrado em 1 dos isolados resistentes ao cloranfenicol. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que as gaivotas das ilhas Berlengas possuem uma grande variedade de espécies fecais de enterococos com perfis de resistência a vários antibióticos.

[Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from Yellow-legged Gulls (*Larus cachinnans*) of Berlengas natural reserve in Portugal]

Objective: Phenotypic and genotypic characterization of the antimicrobial resistance of faecal enterococci recovered from Yellow-legged Gulls of Berlengas natural reserve in Portugal. **Materials and methods:** Fifty four faecal samples were arbitrarily recovered in the soil of Berlengas natural reserve of Portugal during September 2007. Samples were sampled in Slanetz-Bartley agar plates and one colony per sample was isolated. The enterococci recovered were tested for their resistance to 11 antimicrobial agents by disk diffusion method according to CLSI. The identification of enterococci with resistant genes at the species level was performed by biochemical tests and confirmed by molecular methods. The PCR using specific primers was used to determine the genes encoding antibiotic resistance. **Results:** 70% of the enterococci recovered from gulls present resistance against one or more antibiotic agent. Only these strains were identified to species level. *Enterococcus faecium* was the most prevalent in Yellow-legged gulls (52.5%), followed by *E. faecalis* (10%) and *E. hirae* (7.5%). It is interesting to underline the relatively low prevalence of *E. durans* specie (1.5%). High percentages of erythromycin and tetracycline resistance were found among our isolates (95%) and lower percentages were identified for quinupristin-dalfopristin, kanamycin, streptomycin, ampicillin (30%, 22.5%, 17.5% and 15%, respectively), chloramphenicol and ciprofloxacin resistance (12.5%). In this study no gentamicin- or teicoplanin- or vancomycin-resistant enterococci were detected. Thirty eight enterococci showed tetracycline-resistance and the following resistance genes were detected: *tet(M)+ tet(L)* (20 isolates) and *tet(L)* (10 isolates). Eight isolates didn't show any of the *tet* genes tested. The transposons *Tn916/Tn1545* and/or *Tn5387* genes were detected in most of the tetracycline-resistant isolates. The *erm(B)* gene was detected in 63.2% of the erythromycin-resistant isolates. The *vat(D)* and *vat(E)* genes were present in 8.3% and 16.7% of the quinupristin/dalfopristin-resistant isolates, respectively. The *ant(6)-Ia* gene was present in 57.1% of the streptomycin-resistant isolates and seven of the nine kanamycin-resistant isolates carried the *aph(3)-IIIa* gene. The *cat(A)* gene was found in one of the chloramphenicol-resistant isolates. **Conclusion:** This study showed a diversity of faecal enterococci species in sea gulls of Berlengas island as well a high prevalence of antimicrobial resistant isolates.

Actividade *in vitro* da dalbavancina frente a *Enterococcus* spp. de animais selvagens, animais de companhia, frangos e humanos em Portugal

Radhouani, H.^{1,2,3,4}, Gonçalves, A.^{1,2,3}, Sargo, R.¹, Igrejas, G.^{3,4}, Poeta, P.^{1,2*}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 Centro de Estudo de Ciências Animais e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

3 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

4 Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

A dalbavancina é um novo antibiótico lipoglicopéptido relacionado com a teicoplanina com actividade contra organismos Gram-positivos. Investigámos a sua actividade frente a enterococos fecais isolados de animais selvagens, animais de companhia, frangos e humanos em Portugal.

A actividade *in vitro* da dalbavancina foi determinada através da diluição em meio sólido, de acordo com as normas do CLSI, em 589 enterococos de diferentes espécies e origens. Todos os *Enterococcus* spp. susceptíveis à vancomicina foram inibidos com $\leq 0,25$ mg/L de dalbavancina. Apesar das estirpes resistentes à vancomicina mostrarem valores mais elevados de concentrações mínimas inibitórias CMI (16 mg/L), os isolados que exibiram o genótipo de resistência *vanC* foram inibidos com concentrações de $\leq 0,125$ mg/L. Apenas os isolados *vanA* não foram inibidos por baixas concentrações visto que estas estirpes mostraram um valor mais elevado de CMI para o antibiótico (16 mg/L).

[*In vitro* activity of dalbavancin against enterococci isolates from wild animals, pets, poultry and humans in Portugal]

Dalbavancin is a new teicoplanin-related lipoglycopeptide with activity against gram-positive organisms. We investigate the activity of dalbavancin against faecal enterococci isolates from wild animals, pets, poultry and healthy humans in Portugal.

The *in vitro* activity of dalbavancin was determined by microbroth dilution in accordance with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines microdilution methods in 589 enterococci of different species and origins. All vancomycin-susceptible *Enterococcus* spp. were inhibited by ≤ 0.25 mg/L dalbavancin. Although vancomycin-resistant-enterococci -showed higher dalbavancin MIC values (16 mg/L), the isolates that exhibited the VanC resistance phenotype were inhibited at dalbavancin concentrations ≤ 0.125 mg/L. Only *vanA* isolates were not inhibited by low concentrations of dalbavancin since *vanA* strains showed higher dalbavancin MIC values (16 mg/L).

Resistência a antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli* isoladas em suínos

Anastácio, S., Cardoso, A., Cannas da Silva, J.

Laboratório de Medicina Veterinária, Lugar da Sorrateira – Atalaia, 2005-110 Almoester – Santarém.

Entre Janeiro de 2007 e Junho de 2008, foram isoladas 58 estirpes de *Escherichia coli* em suínos com sintomatologia clínica de colibacilose. Após o isolamento e a identificação das estirpes, procedeu-se à realização do teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em meio sólido de acordo com procedimentos descrito pelo CLSI. A sensibilidade das estirpes isoladas foi testada para compostos antimicrobianos, usados em medicina veterinária e humana, pertencentes às classes dos β -lactâmicos, Aminoglicosídeos, Polipeptídeos, Quinolonas, Tetraciclina e ainda as associações Trimetoprim-Sulfametoxazol e Amoxicilina-Ácido Clavulânico. Verificou-se uma maior percentagem de estirpes sensíveis às cefalosporinas de uso veterinário, cefquinoma (92,3%) e ceftiofur (92,5%), enquanto que 53,4% das estirpes demonstraram sensibilidade à colistina e 35,1% das estirpes demonstraram sensibilidade à enrofloxacin. No que respeita às resistências a antimicrobianos, verificou-se uma elevada percentagem de estirpes de *E. coli* resistentes à Tetraciclina (98,3%), Ampicilina (90,7%), associação Trimetoprim-Sulfametoxazol (84,5%), Estreptomicina (82,7%) e Flumequina (72,2%). Pudemos ainda constatar, em 56,9% das estirpes, resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos testados.

[Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from swine]

From January 2007 to June 2008, 58 *Escherichia coli* strains were isolated from swine with colibacillosis. After isolation and identification, strains were tested to antimicrobial susceptibility by the standard disk diffusion method according to CLSI procedures. Antimicrobials, used in veterinary and human medicine, belonging to β -lactam, Aminoglycosydes, Polypeptides, Quinolones and Tetracyclines classes were tested, as for the associations Trimethoprim-Sulfamethoxazol and Amoxicillin-Clavulanic Acid. Strains were most susceptible to cephalosporins of veterinary use, cefquinome (92,3%) and ceftiofur (92,5%), but only 53,5% of tested strains were susceptible to colistin and 35,1% to enrofloxacin. Concerning the antimicrobial resistance, we found very high levels of resistance to Tetracyclin (98,3%), Ampicillin (90,7%), Trimethoprim-Sulfametazol (84,5%), Streptomycin (82,7%) and Flumequine (72,2%). We also found resistance to 3 or more antimicrobials classes in 56,9% of strains tested.

Caracterização genética da resistência a antibióticos em estirpes de *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) produtora de β -lactamases de amplo espectro obtidas de coelhos, em Portugal

Poeta, P.^{1,2}, Radhouani, H.^{1,2,3,4}, Gonçalves, A.^{1,2,3,4}, Figueiredo, N.^{1,2}, Pinto, L.^{1,2,3,4}, Carvalho, C.^{3,4}, Rodrigues, J.^{1,2}, Igrejas, G.^{3,4}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 Centro de Estudo de Ciências Animais e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

3 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

4 Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

Um total de 52 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de coelhos com diarreia foram investigadas quanto à presença de *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC). Nos isolados EPEC foi estudada a resistência aos antibióticos e a presença de β -lactamases de amplo espectro (BLLE). Foi identificado neste estudo um total de 22 EPEC que possuíam ambos os genes codificadores de factores de virulência *eae* e *bfp*. A resistência à ampicilina e à tetraciclina foram as mais frequentes. Dois isolados apresentaram uma sensibilidade intermédia à cefotaxima e um resultado positivo no teste de dupla difusão em disco para a detecção de BLLE. O gene *bla*_{TEM} foi evidenciado na maioria dos isolados resistentes à ampicilina. Os genes *aac*(3)-II ou *aac*(3)-IV foram detectados em 4 isolados resistentes à gentamicina. Adicionalmente, o gene *aadA* foi detectado em 60% dos isolados resistentes à estreptomicina. Os genes *tet*(A) ou *tet*(B) foram identificados em todos os isolados à tetraciclina. Um total de 9 isolados EPEC mostraram o fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim sendo os genes *sul1* e/ou *sul2* e/ou *sul3* detectados em todos eles.

[Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) carrying Extended-Spectrum β -lactamases recovered from diarrheic rabbits in Portugal]

A total of 52 *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic rabbits were investigated for their enteropathogenic *E. coli* (EPEC) pathotype. The EPEC isolates were study for antibiotic resistance and screening for the detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). A total of twenty two EPEC that harboured both *eae* and *bfp* virulence genes were identified in this study. Resistances to ampicillin and tetracycline were the most frequent. Two isolates showed an intermediate susceptibility to cefotaxime and a positive screening test for ESBL was demonstrated. The *bla*_{TEM} gene was demonstrated in the majority of ampicillin-resistant isolates. The *aac*(3)-II or *aac*(3)-IV genes were detected in the four gentamicin-resistant isolates. In addition, the *aadA* gene was detected in 60% of streptomycin-resistant isolates. The *tet*(A) or *tet*(B) genes were identified in all tetracycline-resistant isolates. A total of nine EPEC isolates showed the phenotype SXT-resistant and the *sul1* and/or *sul2* and/or *sul3* genes were detected in all of them.

Resistência a antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli* isoladas em *Gallus gallus*

Cardoso, A., Anastácio, S., Cannas da Silva, J.

Laboratório de Medicina Veterinária, Lugar da Sorrateira – Atalaia, 2005-110 Almoester – Santarém.

Durante o ano de 2007, foram isoladas 52 estirpes de *Escherichia coli* em animais espécie *Gallus gallus* com quadros de colibacilose. Após o isolamento e a identificação das estirpes, procedeu-se à realização do teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em meio sólido de acordo com procedimento descrito pelo CLSI. A sensibilidade das estirpes isoladas foi testada para compostos antimicrobianos, usados em medicina veterinária e humana, pertencentes às classes dos β -lactâmicos, Aminoglicosídeos, Polipeptídeos, Quinolonas, Tetraciclina e ainda a associação Trimetoprim-Sulfametoxazol. Verificou-se uma maior percentagem de estirpes sensíveis à Colistina (95,9%), à Neomicina (69,4%) e à associação Trimetoprim-Sulfametoxazol (60%), enquanto que apenas 47,8% das estirpes demonstraram sensibilidade à Enrofloxacin. No que respeita às resistências a antimicrobianos, verificou-se uma elevada percentagem de estirpes de *E. coli* resistentes à Tetraciclina (88%), ao Ácido Oxolínico (69,4%) e à Ampicilina (66%). Pudemos ainda constatar, em 42,3% das estirpes, uma resistência a mais do que 3 classes de antimicrobianos testados e em 2% das estirpes, uma resistência a todas as classes testadas.

[Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* strains isolated from poultry]

In 2007, 52 *Escherichia coli* strains were isolated from poultry with colibacillosis. After isolation and identification, strains were tested to antimicrobial susceptibility by the standard disk diffusion method according to CLSI procedures. Antimicrobials, used in veterinary and human medicine, belonging to β -lactam, Aminoglycosydes, Polypeptides, Quinolones and Tetracyclines classes were tested, as for the association Trimethoprim-Sulfametoxazol. Strains were most susceptible to Colistin (95.9%), Neomycin (69.4%) and to Trimethoprim-Sulfametoxazol association (60%) but only 47.8% of the tested strains were susceptible to Enrofloxacin. Concerning the antimicrobial resistance, we found high levels of resistance to Tetracyclin (88%), to Oxolinic Acid (69.4%) and to Ampicillin (66%). We also found resistance to more than 3 antimicrobials classes in 42.3% of tested strains and in 2% there was a resistance to all of antimicrobials classes tested.

Resistência a antimicrobianos em estirpes de campo de *Mycoplasma bovis* originárias de diversas localizações geográficas

Antunes, N.T.^{1,5}, Tavío, M.M.², Gonçalves, R.³, Rifatbegovic, M.⁴, Assunção, P.¹, Rosales, R.S.¹, Regalla, J.³, Poveda, J.B.¹

1 Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva. Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas

2 Microbiología, Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria

3 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

4 Department of Microbiology and Infectious Disease, Veterinary Faculty, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

5 Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal

Foi determinada a susceptibilidade in vitro de estirpes de campo de *Mycoplasma bovis* a diversos agentes antimicrobianos. Foram utilizadas 10 estirpes Portuguesas, 8 Bósnias e 2 alemãs isoladas de pulmão, zaragatoa nasal e leite, para além da estirpe de referência. Esta determinação foi realizada em microplaca utilizando uma técnica de microdiluição. Os antimicrobianos mais eficazes foram as fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos e lincomicina. Detectou-se resistência a quinolonas, tetraciclina, macrólidos, lincomicina e aminoglicosídeos. As diferenças encontradas nas susceptibilidades estão relacionadas com a origem geográfica das estirpes, mas não com o tipo de amostra clínica.

[Antimicrobial resistance amongst *Mycoplasma bovis* field strains from different geographic origins]

In vitro susceptibilities of 10 Portuguese, 8 Bosnian and 2 German *Mycoplasma bovis* field strains isolated from milk and lung samples and nasal swabs, to 15 antimicrobials were determined using a broth microdilution method. The most effective antimicrobials were fluoroquinolones, tetracyclines, macrolides and lincomycin. Resistance to quinolones, tetracyclines, macrolides, lincomycin and aminoglycosides was detected. Differences among strain susceptibilities were correlated with their geographic origin but not to clinical sample type.

Aplicación del ATP bioluminiscencia para determinar la limpieza de equipos de ordeño

Vilar, M.J.¹, Rodríguez-Otero, J.L.¹, Diéguez, F.J.^{1,2}, Sanjuán, M.L.¹, Yus, E.¹

¹ Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela

² Dpto. de Anatomía y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela

El método de ATP bioluminiscencia fue usado para determinar el grado de limpieza de diversas superficies de equipos de ordeño (gomas de las pezoneras, colectores, unidades finales y puntos de conexión al circuito) en explotaciones de bovino lechero de Galicia (noroeste de España) con ordeño en sala, en plaza mediante circuito y en plaza con cántara. Las superficies más limpias fueron las gomas de las pezoneras. El uso de agua no clorada y los sistemas de ordeño en plaza mediante circuito y en plaza con cántara estuvieron asociados a valores de ATP bioluminiscencia más elevados. Sin embargo, los valores de ATP bioluminiscencia únicamente explicaron un 12% de la variabilidad del recuento bacteriano en leche de tanque; esto es atribuible a la importancia de otros factores (principalmente el correcto funcionamiento del sistema de refrigeración del tanque) para mantener el recuento bacteriano bajo.

[Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment]

The ATP bioluminescence method was used to evaluate the cleanliness of milking equipment surfaces (teat cup rubbers, teat dip containers, milk receivers, and pipeline joints) in dairy farms in Galicia (northwest Spain) with parlour, pipeline tie-stall or bucket tie-stall milking. The cleanest surfaces were teat cup rubbers. The use of non-chlorinated water for cleaning, and of pipeline or bucket tie-stall milking systems, was associated with high ATP bioluminescence values. However, ATP bioluminescence values only explained 12% of the variability in bulk-tank bacterial count; this is attributable to the importance of other factors (notably the correct functioning of the tank cooling system) for maintenance of low bacterial count.

Antibioresistencias em coliformes termotolerantes isolados de tábuas de corte

Santos, A.¹, Tavares, C.¹ e Brandão, C.²

1 ETGI polo Sintra

2 Laboratório de Microbiologia Alimentar, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

Objectivos: As resistências aos antibióticos constituem um grave problema de saúde pública, no entanto os dados referentes a estirpes potencialmente não patogénicas, que constituem a flora microbiana de alimentos são escassos, nomeadamente em relação a alimentos consumidos crus e com uma importante carga microbiana, como são os vegetais

Metodologias: Com esse objectivo as tábuas de corte, foram avaliadas em relação às características das resistências aos antibióticos presentes em estirpes de coliformes termotolerantes nelas recolhidas. O trabalho foi efectuado em quatro cozinhas de estabelecimentos de catering.

Resultados: Do total das estirpes estudadas, foram observados 15 diferentes perfis de antibioresistência em relação a 12 antibióticos testados, distribuídas de diferente forma pelos 4 locais de colheita; local A – 2 perfis; local B – 8 perfis; local C – 6 perfis; local D – 7 perfis. Os antibióticos em relação aos quais se verificaram uma maior percentagem de resistência individual foram a; amoxiciclina+ácido clavulâmico e a ampicilina, respectivamente 27,6% e 25,9%. Foram observados perfis de uma grande complexidade, nomeadamente 12 perfis a 9 antibióticos em simultâneo.

[Antibioresistance in thermotolerant coliforms obtained from chopping boards]

Objectives: The resistance to antibiotics is a serious public health problem, however data for potentially non-pathogenic strains that are part of the microbial flora of food are scarce, especially on foods that are eaten raw and with a significant microbial load, such as salads.

Methods: Areas where food is prepared - including cutting boards, were evaluated in relation to the characteristics of antibiotic resistance of strains of thermotolerant coliform (that were previously collected in these areas). This study was performed in 4 different catering kitchens.

Results: Of all strains studied, we observed 15 different profiles of antibioresistance in relation to 12 antibiotics tested, distributed in differently according to the 4 kitchens; The site A - 2 profiles, Site B - 8 profiles; site C - 6 profiles, site D - 7 profiles. Antibiotics for which there is a higher percentage of individual resistance was: Amoxicillin + Clavulanic acid and ampicillin, respectively 27.6% and 25.9%. We observed profiles of great complexity, including 12 profiles that were resistant to 9 antibiotics simultaneously.

Actividade lipolítica de leveduras em enchidos tradicionais portugueses

Almeida, I.¹, Barreto, A.S.², Matos, T.J.³

1 Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

3 Instituto Superior de Agronomia, TULisbon

Os produtos à base de carne tradicionais apresentam uma grande variedade comercial, como resultado da diversidade das matérias primas cárneas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados. A produção de enchidos necessita estar de acordo com a legislação aplicável a esta actividade. Os objectivos dos produtores são manter uma qualidade constante dos produtos e garantir a respectiva segurança sanitária.

A qualidade do produto pode estar em causa sempre que se desenvolvem microrganismos que comprometam o sabor, o cheiro, a consistência e o aspecto dos enchidos, ou seja, microrganismos envolvidos em processos glucolíticos, proteolíticos e lipolíticos. A presença de leveduras lipolíticas pode afectar a qualidade destes géneros alimentícios. A β -oxidação peroxissomal das leveduras resulta na produção de peróxido de hidrogénio e ácidos gordos livres pela sua degradação incompleta.

A micoflora dos enchidos regionais portugueses tem manifesta influência na decomposição e por isso afecta negativamente a qualidade deste tipo de produtos. O facto de alguns fungos contaminantes dos enchidos se conseguirem multiplicar a valores de aW baixos, a elevada pressão osmótica e a $\text{pH} < 5$, confere-lhes vantagens na colonização e multiplicação nestes produtos.

Foram efectuadas contagens e isolamentos da micoflora de contaminação de morcelas (n=4), chouriços (n=4), farinheiras (n=3) e linguiça (n=1), embalados em atmosferas modificadas, em duas fases distintas do circuito comercial, por forma a avaliar o teor destes agentes: no início e no fim do prazo de validade do produto.

Cada tipo de colónia isolada foi observada para caracterização das morfologia macro e microscópica e identificação bioquímica até à espécie. A identificação das leveduras foi realizada em galerias bioquímicas monitorizadas convencionais (Sistema API, ID32C – Bio-Merieux, 32200), e a leitura das provas bioquímicas foi efectuada automaticamente através do sistema ATB (BioMerieux- 14200). Cada levedura identificada foi submetida a testes para detecção de actividade lipolítica. Usando Tributirina Agar (Oxoid, PM004C, Basingstoke, England) foram consideradas positivas as colónias que exibiam halos transparentes na sua periferia.

Na primeira fase do estudo (início do prazo de validade), 75,0% das amostras foram positivas ($n^+=9$, contagens entre $5,9 \log_{10}$ UFC/g e $1,8 \log_{10}$ UFC/g). Na segunda fase do estudo (fim do prazo de validade), apenas 33,3 % das amostras foram positivas ($n^+=4$, contagens entre $5,7 \log_{10}$ UFC/g e $3,4 \log_{10}$ UFC/g); registando-se assim uma considerável redução no teor das leveduras.

Identificou-se *Saccharomyces cerevisiae* (53,57%), *Candida pelliculosa* (41%), *C. holmii* (1,32%), *Zygosaccharomyces* spp. (0,86%), *Kloeckera japonica* (0,04%) e *Penicillium* spp. A actividade enzimática lipolítica foi detectada em 98,6% dos isolados de leveduras estudados.

[Lipolytic activity of yeasts in Portuguese traditional dry sausages]

Portuguese traditional meat products exhibit a great commercial variety, as a result of its raw meat materials, ingredients and processing diversity. Sausages production must be in agreement with legislation for this activity. Mainly goals of producers are to maintain a uniform quality and safety of these products.

Several microorganisms (lipolytic, glucolytic and proteolytic microorganism) can develop in dry sausages and undertake their organoleptic characteristics. Considering so, the presence and development of lipolytic yeasts can affect product quality. Peroxisomal β -oxidation of yeasts results in the production of hydrogen peroxide and free fatty acids in their incomplete degradation.

Traditional dry sausages mycoflora can develop in extreme conditions such as low aW values, high osmotic pressure and $\text{pH} < 5$, giving them advantage in colonization and development in these products.

A total of twelve random samples of Portuguese traditional dry sausages – “morcelas” (n=4), “chouriços” (n=4), “farinheiras” (n=3) and “linguiça” (n=1), packed in modified atmospheres, were collected and subjected to mycological evaluation, both in the beginning and at the end of the shelf life of the products.

Yeast colonies were enumerated and each isolated colony was observed microscopically for morphological characterization and identification at genus level. Yeast identification was based in biochemical monitored conventional kits (API System, ID32C – Bio-Merieux, 32200). Lipolytic activity was tested using Tributyrin Agar (Oxoid, PM004C, Basingstoke, England). Positive colonies exhibit rise to clear digested zones surrounding the colonies.

In the first study phase (in the beginning of the shelf life), 75.0% of the samples were positive ($n^+=9$; with $5.9 \log_{10}$ UFC/g to $1.8 \log_{10}$ UFC/g). In the second study phase (at the end of the shelf life) only 33.3% of the samples were positives ($n^+=4$; with $5.7 \log_{10}$ UFC/g to $3.4 \log_{10}$ UFC/g). *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* (41%), *C. holmii* (1.32%), *Zygosaccharomyces* spp. (0.86%), *Kloeckera japonica* (0.04%) and *Penicillium* spp were isolated. The predominant yeast species that were isolated from Portuguese traditional dry sausages were *Saccharomyces* spp. and *Candida* spp. Lipolytic activity was observed in 98.6% of these identified species.

Avaliação da qualidade higio – sanitária da carne de frango: pesquisa de *Listeria monocytogenes* por PCR

Caleiro, P., Fernandes, M.J., Fernandes, H., Fraqueza, M.J.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

O consumo de carne de frango, nas diferentes apresentações existentes, tem em Portugal uma enorme expressão, pelo que a segurança destes produtos é de extrema importância.

A *Listeria monocytogenes* é ubiqüitária, adaptando-se facilmente a ambientes refrigerados e com possibilidade de aumentar a sua termotolerância quando submetida a stress térmico o que a torna um enorme desafio para a garantia da segurança alimentar.

A listeriose, doença causada pela infecção por *Listeria monocytogenes* no homem, é particularmente grave em grávidas, recém-nascidos, crianças, idosos e imunodeprimidos ou debilitados, todos eles potenciais consumidores de carne de frango uma vez que se trata de um alimento nutritivo e equilibrado muito adequado à alimentação destes indivíduos. A prevalência da doença embora reduzida, tem vindo a aumentar registando uma taxa de mortalidade elevada.

Os frangos são portadores de *Listeria monocytogenes*, excretando a bactéria e contaminando as caixas de transporte, as linhas de abate e os locais de manipulação das carcaças e derivados resultantes da desmancha. O peito de frango, chega ao consumidor final na forma refrigerada e em embalagem de atmosfera modificada, o que permite alongar os prazos de validade mas possibilita o crescimento deste agente patogénico, quando presente.

Este trabalho teve como objectivo principal avaliar a frequência de aparecimento de *Listeria monocytogenes* em peitos de frango, utilizando uma metodologia alternativa baseada na reacção em cadeia da polimerase (PCR). Em amostras de peitos de frango (n=52) obtidos por desmancha de carcaças de acordo com as praticas habituais de um operador, transportadas para o laboratório em carrinha refrigerada e segundo as práticas normais de distribuição para o comércio, realizou-se a pesquisa de *Listeria monocytogenes* de acordo com o método da ISO 11290-1 e pela metodologia PCR. Testou-se a sensibilidade desta metodologia alternativa tendo-se para isso inoculado diferentes concentrações de UFC de *Listeria monocytogenes* 4a em peitos de frango. A sensibilidade calculada para a metodologia utilizada foi de 1ufc/g. A avaliação da presença deste agente patogénico pela metodologia alternativa acoplada a PCR, efectuada a partir da fase de enriquecimento selectivo Fraser I, permitiu concluir que todas as amostras foram negativas para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25 g.

[Poultry meat higio – sanitary evaluation: *Listeria monocytogenes* detection by PCR]

The consumption of poultry meat and their products has an enormous relevance in Portugal, being the safety of these products particularly important.

The *Listeria monocytogenes* is a ubiquitous microorganism, well adapted to refrigerated environments and with the possibility to increase its termotolerance under heat stress, turning it an enormous challenge to food safety.

Listeriosis is a severe infectious disease, particularly serious to pregnant women, newborns, young children, elderly people and immunocompromised patients, all potential consumers of poultry meat. This kind of meat is recognised as a nutritional and balanced food, very suitable to feed these risk groups. The prevalence of the disease is reduced, but it has increased in the last years with a high fatality rate among susceptible populations.

The broilers are carriers of *Listeria monocytogenes*, spreading this bacterium and contaminating transport boxes, slaughter lines and all environments where carcasses and deboned products are manipulated. Poultry breasts are presented to final consumer refrigerated under modified atmosphere packaging which increase product shelf life but allows the development of this pathogen when present.

The main aim of this work was to evaluate the prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry breasts using a rapid methodology based in Polymerase Chain Reaction (PCR). Breasts poultry samples (n=52) were obtained after carcass broiler deboning as the operator labour practices and transported to the laboratory in a refrigerator vehicle according to current distribution practices. The detection of *Listeria monocytogenes* was performed according to classical method ISO 11290-1 and rapid PCR method. Rapid method sensibility was tested on breast poultry samples inoculated with different UFC *Listeria monocytogenes* 4a concentrations. The sensibility of the used methodology was 1 UFC/g. The detection of this pathogen by PCR methodology performed after selective enrichment Fraser I, allows to conclude that all samples were negative to *Listeria monocytogenes* in 25 g.

Monitorização micotóxica de alimentos compostos para animais produzidos em Portugal

Costa, J.M.¹, Bernardo, F.¹ e Martins, H.M.²

¹ Direcção Geral de Veterinária (DGV), Largo da Academia Nacional das Belas Artes, 2 - 1249-105 Lisboa

² INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

A obtenção de resultados satisfatórios em termos de saúde humana ou animal, do bem-estar dos animais e do ambiente, depende em grande medida da salubridade dos alimentos para animais. A ocorrência de substâncias indesejáveis, como o caso das micotoxinas, susceptíveis de constituir perigo iminente na cadeia alimentar pelo efeito tóxico que exercem em diversas espécies animais, constitui um motivo de preocupação para a indústria dos alimentos para animais com o consequente impacto socioeconómico e desconfiança por parte dos consumidores sobre os produtos produzidos. Há assim que limitar a sua presença, mediante uma monitorização efectiva que garanta a comercialização e utilização de alimentos adequados à satisfação das necessidades dos animais salvaguardando a sua própria saúde, bem como a do consumidor, mediante a produção de géneros alimentícios apropriados.

A DGV enquanto autoridade nacional competente, é a responsável pela planificação, coordenação e execução do controlo oficial no âmbito da alimentação animal, que prevê, entre outras acções, a recolha de amostras de produtos finais a nível de todos os fabricantes nacionais para pesquisa e doseamento de micotoxinas produzidas por alguns géneros de fungos, de acordo com as espécies/categorias animais de maior sensibilidade. Assim referimos a Aflatoxina B1 (AFB1) e a Ocratoxina (OTA), produzidas por *Aspergillus* spp, bem como a Zearalenona (ZEA), Fumonisinias (FB1+ FB2) e Deoxinivalenol (DON) produzidas por *Fusarium* spp. Sendo a sua presença uma realidade, constata-se contudo uma maior prevalência de AFB1, que em alguns casos ultrapassa inclusive os limites máximos admissíveis (LMA) regulamentares, o que constitui um risco emergente em termos de segurança alimentar.

Para além da necessidade de um controlo oficial mais abrangente e sistemático, deve-se igualmente assegurar que os operadores do sector dos alimentos para animais tenham em consideração os LMA e/ou os valores de orientação estabelecidos para micotoxinas, na implementação dos seus sistemas de análise de perigos e pontos críticos de controlo (APPCC).

[Mycotoxin monitoring of portuguese compound feeds]

Satisfactory results in terms of public and animal health, animal welfare and the environment depend to a large extent on the use of wholesome feeds. Occurrence of undesirable substances, such as mycotoxins, which can endanger food chain by their toxic effect in several animal species, represents a matter of concern for feed industry with consequent socioeconomic impact and consumers mistrust on the products of animal origin. Therefore, there is a need to restrict their presence by a proper monitorization that will allow the marketing and use of feeds for satisfying animal nutritional requirements, also ensuring animal and human health by means of the production of safe foods.

DGV as national competent authority is responsible for planning, coordination and execution of official inspections in the field of animal nutrition, which foresees, besides other activities, sampling of compound feedingstuffs at all national operators, for the analysis of some fungi species mycotoxins, according to the most sensitive animal species and categories. We refer to Aflatoxin B1 (AFB1) and Ocratoxin A (OTA), produced by *Aspergillus* spp, as well as Zearalenone (ZEA), Fumonisinias (FB1+ FB2) and Deoxynivalenol (DON) produced by *Fusarium* spp.

Occurrence of mycotoxins in national compound feeds is a reality, with AFB1 as the most prevalent exceeding in some cases the maximum levels legally fixed, leading to an emerging risk for feed and food safety.

Besides a more systematic control, it must be ensured that feed business operators are using in their Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system, the guidance values and maximum levels established by communitarian and national legislation for mycotoxins in animal feeding.

Pesquisa de tecido do Sistema Nervoso Central em masséteres de bovino

Silva, J.C., Machado, C., Carvalho, R., Santos, A. e Orge, L.

INRB IP, LNIV, Estrada de Benfca, 701, 1549-011 Lisboa

Os dados epidemiológicos e os resultados da caracterização biológica sugerem que a origem da variante de Creutzfeldt Jakob Disease (vCJD) nos humanos esteja relacionada com o consumo de carne e produtos cárneos contaminados com o agente da BSE, que se encontra presente, na sua maioria, no Sistema Nervoso Central (SNC). Deste modo, e como medida preventiva, a Comunidade Europeia e o Governo Português emitiram legislação adequada no sentido de proibir na cadeia alimentar a entrada de produtos cárneos susceptíveis de contaminação com o agente da BSE.

Uma das principais medidas aplicadas definiu que os países dos Estados-Membros deveriam retirar da cadeia alimentar os tecidos mais susceptíveis de apresentarem risco de BSE, ou seja os Materiais de Risco Específico (MRE).

Com o Regulamento nº999/2001, estabeleceram-se regras relativas à remoção dos MRE, e, sendo Portugal um país de risco para BSE, ficou obrigado à remoção e destruição das cabeças de todos os bovinos com mais de 12 meses abatidos para consumo. Contudo, em Junho de 2003, com o Regulamento nº1139/2003, a Comunidade Europeia alterou o Regulamento nº999/2001 no que se referia aos MRE. Com as alterações vigentes, os Estados-Membros encontram-se autorizados a aproveitar a carne da cabeça (masséteres), devendo para tal aplicar um sistema de controlo reconhecido por uma autoridade competente, por forma garantir a prevenção de eventual contaminação com tecido de SNC. Este sistema de controlo deverá incluir um plano de amostragem com recurso a um teste laboratorial adequado para a detecção de tecido do SNC, no sentido de verificar se as medidas destinadas a reduzir a contaminação são adequadamente aplicadas.

Tendo em conta as medidas descritas no Regulamento, e a pedido de vários Matadouros, o Sector das EETs do LNIV iniciou em 2006 a realização de um ensaio laboratorial – Pesquisa de MRE em produtos cárneos - recorrendo ao kit comercial Ridascreen Risk Material® da empresa Biopharm. Até Setembro de 2008, foram realizados 1064 testes em lotes de masséteres, tendo sido detectada contaminação em apenas 5 lotes.

[Screening for Central Nervous System tissue in head meat]

The occurrence of variant Creutzfeldt Jakob Disease (vCJD) in humans is probably related with the consumption of meat and meat products infected with the agent responsible for BSE, which is mostly found in the Central Nervous System (CNS). Therefore to avoid the risk of human infection, the European Community and the Portuguese Government issued laws to prevent the entry of possibly infected meat products in the food chain. The removal of Specified Risk Material (SRM) is one of the main measures taken to achieve this goal.

The Regulation nº999/2001 has stated the rules concerning the SRM including the removal and destruction of all the heads of bovines above 12 months of age slaughtered for human consumption. However, after the revision of the Regulation nº999/2001 implemented in June 2003 by the Regulation nº1139/2003, the measures regarding SRM have changed. These changes have authorized the human consumption of head meat within the Member-States. Nevertheless, a sampling plan, using an appropriate laboratory test to detect CNS tissue, should be in place in order to verify that measures to reduce contamination were properly implemented.

In 2006, the TSE Unit of LNIV has begun the screening for CNS using an available commercial kit – Ridascreen Risk Material® – from the company Biopharm and until September 2008, only 5 batches of head meat tested positive from a total of 1064 analysed.

Causas de rejeição hepática de bovinos e suas implicações económicas

Marques, V.², Vala, H.¹, Monteiro, L.², Mesquita, J.¹

1 Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

2 Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

O estudo das vísceras dos animais abatidos apresenta uma importância vital para o conhecimento das ameaças para a segurança alimentar e daí para a saúde humana. O fígado de bovino é um órgão edível, de valor económico diferenciado, e susceptível a diversos tipos de lesões devido à sua função metabólica. Existem várias causas de rejeição hepática.

Assim, o objectivo deste trabalho consistiu no estudo determinado das rejeições hepáticas em bovinos, associadas aos meses, idade, sexo e raça, bem como nas suas implicações económicas.

No período de Março, Maio e Junho de 2007, no matadouro Mapicentro S.A. situado em Ponte das Mestras em Leiria, sob o serviço do corpo de inspecção da Direcção Geral de Veterinária, foram inspeccionados 156 bovinos. Destes 28 (18%) fígados foram rejeitados pelos respectivos inspectores, durante a rotina de inspecção post-mortem, por apresentarem alterações ou lesões hepáticas. O mês de Junho foi aquele onde se registou mais rejeições hepáticas assim como nos machos, na raça brava e bovinos com mais de 30 meses.

As causas mais frequentemente detectadas foram as distomatoses (29%), as aderências (21%), *Fasciola hepatica* (14%), telangiectasia (14%), consistência anormal (7%), abscessos (4%), conspurcação (4%), coloração anormal (4%) e *Dicrocoelium dendriticum* (4%).

Concluiu-se que no respectivo período houve uma perda económica, devido a rejeições hepáticas, de cerca de 398,97 euros. Pelo valor económico significativo justifica-se o estudo das causas de rejeição hepática, permitindo-se assim uma avaliação, ainda que precoce, da incidência dessas patologias.

[Causes for hepatic rejections in bovines in abattoirs and its economic implications]

The study of the slaughtered animals viscera is of vital importance for the understanding of threats to food safety and hence to human health. The bovine liver is an edible organ of differentiated economic value and susceptible to various types of injuries due to their metabolic function. There are several causes of liver rejection.

The aims of the present work were to study liver rejections in cattle, associating them with the time of year of slaughter, age, sex and breed as well as their economic implications.

In the period of March, May and June of 2007 in the Mapicentro S.A. abattoir located in Ponte das Mestras in Leiria, under the supervision of the official meat inspectors, 156 bovines were examined. Of these, 28 (18%) were rejected during the post-mortem routine inspection by the meat inspectors, due to changes or hepatic lesions. The month of June had more liver rejections, such as the males, Brava breed and bovines over 30 months of age.

The more frequently found causes of rejection were distomatosis (29%), hepatic adherences (21%), *Fasciola hepatica* (14%), telangiectasia (14%), abnormal consistence (7%), abscesses (4%), conspurcation (4%), abnormal color (4%) and *Dicrocoelium dendriticum* (4%).

In conclusion for the duration of this study, the economic loss due to the sum of all hepatic rejections was of approximately 398,97 euros. This amount justifies further studies of hepatic rejections allowing the assessment of the occurrence of these pathologies.

Controlo analítico da eficácia das operações de limpeza em restauração: comparação entre métodos clássicos e rápidos

Brandão, C.¹, Lopes, S.², Morgado, C.³, Medeiros, V.², Viegas, C.³

1 Laboratório de microbiologia alimentar, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

2 ETGI polo Sintra

3 ESHTe

Objectivos: Um dos factores decisivos em termos de segurança alimentar na restauração, são as condições de higiene das superfícies com as quais os alimentos contactam. A eficácia das operações de limpeza e desinfecção (OLD) na produção de refeições deve ser avaliada e validada, de forma a evitar sobrevivência bacteriana e posterior formação de biofilmes. Este trabalho teve como principal objectivo comparar os resultados obtidos a partir de diferentes métodos usados na avaliação da eficácia das OLD, em diferentes superfícies de trabalho numa cozinha, nomeadamente: bancada de inox, bancada de mármore e tábuas de corte em polietileno.

Metodologia: Os métodos seleccionados para comparação, foram métodos ditos “clássicos”, que consistiram na quantificação da flora microbiana - mesófilos a 30 °C e *Pseudomonas* spp e métodos ditos “rápidos”, quantificação de ATP (luminometria) e de resíduos orgânicos, remanescentes após a OLD das superfícies (reação multienzimática colorimétrica). **Resultados:** Verificou-se que os resultados obtidos pela contagem de mesófilos e por luminometria são coerentes / estão relacionados ($p=0,000$). No entanto, as contagens de mesofilos e o teste rápido colorimétrico não são muito coerentes ($p=0,15$). Não se verifica qualquer relação entre os testes rápidos. Entre as contagens de mesófilos e *Pseudomonas* spp, observa-se uma dependência forte ($p=0,000$), podendo estabelecer-se uma correlação de 0,749 ($p=0,01$).

[Analytic control of cleaning operations in food catering: classic and rapid methods comparison]

Objectives: One of the most important considerations in food safety, is the hygiene of the surfaces that food comes in contact with. The efficacy of cleaning practices must be evaluated and validated to avoid bacteria growth and biofilm formation.

Methods: This study aim to compare the results from different evaluation methods among different kitchen surfaces: inox surface, marble surface and chopping boards. The methods selected for comparison were classic methods for microbial quantification – Aerobic mesofils and *Pseudomonas* spp – and rapids tests – ATP quantification (luminometry) and organic residues (multi-enzymatic reaction).

Results: The results from aerobic mesofils and luminometry prove to be correspondent ($p=0,000$). However mesofils does not seem to be correspondent with rapid test for organic residues ($p=0,15$). There is no relation between the two rapid testes (luminometry and organic residues). We found a strong relation between the two classic methods (aerobic mesofils and *Pseudomonas*), and established a correlation of 0,749 ($p=0,01$).

Efeito de stress ácido na sobrevivência de *Campylobacter jejuni*

Pires dos Santos, T.¹, Birk, T.², Nielsen, D.S.², Knøchel, S.²

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Department of Food Science (Food Microbiology), The Faculty of Life Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark

Considerando que a tolerância ao ácido é um importante factor de virulência de agentes patogénicos veiculados por alimentos, e o expressivo aumento, nos últimos anos, da incidência de *Campylobacter jejuni* como agente etiológico de campilobacteriose humana, este trabalho teve como objectivo avaliar a capacidade de *C. jejuni* sobreviver em condições de stress ácido. Estirpes de diferentes origens (referência, isolados de peru) sujeitas a diferentes factores de stress (acidez e temperatura) foram testadas avaliando-se a sua sobrevivência em meio líquido (pH 5,0 e 7,0). As condições experimentais foram efectuadas a duas temperaturas diferentes: 4 °C e 37 °C. Células de *C. jejuni* mostraram-se muito sensíveis a stress ácido a 37 °C, enquanto a 4 °C foram mais resistentes. As curvas de sobrevivência foram descritas pelos modelos Weibull ou pelo modelo clássico de inactivação de primeira ordem, tendo-se concluído através dos coeficientes de regressão (R²), raízes quadradas do erro médio (RMSE) e gráficos de correlação que o modelo Weibull se adequa melhor aos dados apresentados que o modelo tradicionalmente utilizado. O rácio da emissão de fluorescência medida pela técnica de microscopia óptica invertida foi utilizado para determinar o pH intracelular (pHi) como indicador do estado fisiológico das células de *C. jejuni*, a um nível celular único, após aplicação de um tratamento com ácido clorídrico (1M HCl, pH 4,0) em meio de cultura líquido. Para todas as estirpes testadas, o pHi de células saudáveis encontrava-se acima de 7,0. Após exposição a HCl em meio líquido, foi detectado para uma estirpe seleccionada, um decréscimo imediato do pHi para 5,5 (limite de detecção) na maioria das células observadas (75%) ao fim de 15 minutos. Os resultados da medição de fluorescência revelaram um aumento de subpopulações com pHi>5,5 para essa estirpe, nomeadamente subpopulações com 5,5<pHi<6,0 e 6,0<pHi<6,5 em 200 min. de exposição a HCl. Estes resultados indicam que algumas estirpes de *C. jejuni* poderão utilizar determinadas estratégias de recuperação para exteriorizar prótons e elevar o pHi. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes.

[Acid stress response in *Campylobacter jejuni*]

Considering that the acid tolerance is an important virulence factor of foodborne pathogens and the expressive increasing of incidence of *Campylobacter jejuni* in recent years as etiologic agent of human campylobacteriosis, this work aimed to evaluate the ability of *C. jejuni* to survive under acid stress. Strains of different origins (reference, turkey isolates) and tolerance to particular stresses (acid and temperature) were tested for survival in liquid defined media with pH values of 5.0 and 7.0 adjusted with 1M HCl. Experimental conditions were performed at 2 different temperatures: 4 °C and 37 °C. *C. jejuni* cells were found to be very sensitive to acid stress at 37 °C, whereas they were more resistant at 4 °C. The survival curves were either described by the Weibull or traditional first-order model and goodness of fit of these models was investigated. Regression coefficients (R²), root mean square error (RMSE) and correlation plots suggested that Weibull model produced a better fit to the data than the traditional model. Fluorescence Ratio Imaging Microscopy (FRIM) was used to determine intracellular pH (pHi) as an indicator of the physiological state of *C. jejuni* cells at the single cell level after treatment with hydrochloride acid (1M HCl, pH 4.0) in liquid defined medium. For all the tested strains pHi of healthy cells was found to be above 7.0. After exposure to HCl in liquid medium an immediate decline in pHi to 5.5 (detection limit) was observed in the majority of cells (75%) of a selected strain within 15 minutes. The FRIM results revealed that the subpopulations with pHi>5.5 increased for this strain, especially subpopulations with 5.5<pHi<6.0 and 6.0<pHi<6.5 following 200 min. of exposure to HCl. This indicates that some strains of *C. jejuni* may employ certain recovery strategies to extrude protons and to increase pHi. However, more research is needed to elucidate the mechanisms.

Caracterização físico-química da carne de frangos provenientes de diferentes sistemas de produção

Yersan, T.*, Brito, N.V.

Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Refóios do Lima

A carne da galinha, uma das carnes as mais consumidas no mundo, é um tipo importante de carne de ave doméstica. Tradicionalmente, em tempos antigos, a galinha era produzida em sistemas extensivos, proveniente de raças autóctones, em circunstâncias idênticas às da actual “Agricultura Biológica”. Sabor e uma textura bem notória e particularmente reconhecida, cor da pele amarela, a sua aceitação pelo consumidor tem sido favorecida e recuperada, surgindo novos produtos “gourmet”, como o “capão”. Consequentemente, a caracterização produtivas, genética, sanitária das aves, bem como a físico-química e sensorial do produto, ou um plano de marketing, devem ser promovida e valorizada, tanto em Portugal como na Arménia. Por outro lado, em sistemas de produção mais intensivo, baseados em raças comerciais, o sabor, a textura e uma cor razoavelmente neutra são característicos, preferindo o consumidor, preço à qualidade. A expressão “Gosto a Frango” é uma citação corrente que nada qualifica a qualidade da carne. O objectivo deste estudo é a análise, em dois sistemas de produção, intensivo “Frango do Aviário” e extensivo “Frango do Campo”, da caracterização de parâmetros físico-químicos da carne de frango, a fim melhor conhecer a influência da qualidade na opção do consumidor e seu futuro impacto em Saúde Pública.

Dez diferentes animais de cada sistema de produção e diferentes produtores foram analisados. Em sistemas de produção intensiva (sistema da jaula, fechado), as raças comerciais (Redbro) foram consideradas, com uma idade ao abate de 42 dias. Em sistemas extensivos (sistema livre, tipo aberto), as raças autóctones foram consideradas, com uma idade ao abate de 50 semanas. As amostras foram provenientes de peças diferentes (coxa, peito) para proceder a uma análise comparativa. As Normas Portuguesas para a proteína, a gordura, a humidade e a cinza foram observadas.

Os nossos resultados demonstraram não existir qualquer diferença significativa, para a humidade e cinzas, entre os dois sistemas de produção ou peça da carne. Diferenças significativas para a gordura e proteína, foram constatadas, para sistemas de produção e peça, com valores mais elevados da proteína e gordura para o “Frango do Campo”. Valores significativamente mais elevados de proteína e mais reduzidos de gordura foram constatados, para o peito, relativamente à coxa.

Estes dados preliminares revelam a importância de melhor caracterizar o produto final em função do sistema de produção, do tipo e da peça consumida para melhor conhecer o perfil e a escolha do consumidor, tendo em vista o impacto na Saúde Pública.

[Evaluation of physicochemical characteristics of different chicken production systems]

The chicken meat, one of the most consumed meats in the world, is one important type of poultry meat. Traditionally, in the old times, chicken were produced in extensive systems, based in autochthonous breed, in similar conditions to present organic farming. A well-recognized and characteristic flavor and texture, yellow skin color, improve consumer acceptance and the appearance of new differentiate gourmet product, as “capon”. In consequence, genetic, productive, physicochemical, sensorial and sanitary characterizations, as well as a substantial marketing plan, are, at the moment, lines of different research in autochthonous chicken breeds in Portugal and Armenia. In opposite, in more intensive production systems, based in commercial breeds, a fairly neutral flavor, texture and color is characteristic, with the consumer preference to the price in spite of the meat quality. En effect, the expression "taste like chicken" is one current citation, which did not qualify positively the meat quality.

The aim of this study is the analysis, in the two chicken production systems, intensive “Frango do Aviário” and extensive “Frango do Campo”, different physicochemical parameters meat characterization, in order to predict quality meat influence in consumer option.

Ten different animals of each system production and from different producers were analyzed. In intensive production systems (cage system, close type), commercial breeds (Redbro) were considered with a 42 days slaughter age. In extensive systems (free system, open type), autochthonous breeds were considered with a 50 weeks slaughter age. Samples were collected from different parts (legs, breast) for comparable analysis. Portuguese norms (Meat and meat products - ISO 937:1978 renewed in 2002-11-05) for protein, fat, moisture and ash were observed.

Our results show that no significant differences were observed, in moisture and ashes, between production systems or chicken meat piece. However, a significant difference in fat and protein, for production systems and meat chicken were verified with higher level of protein and fat in “Frango do Campo” product. Simultaneously, significant higher protein levels were observed in the breast piece, in opposite significant lower fat level in the some chicken part.

These preliminary data reveal the importance of production systems, type, portion and meat characteristics knowledge to better analyze consumer choice and, consequently, their impact in Public Health.

Programa de Vigilância da Gripe Aviária - Resultados de 2007 e 2008

Tavares Santos, P., Cara D'Anjo, A., Pina Fonseca, A.

Direcção Geral de Veterinária

Desde 2003 que Portugal tem implementado programas de vigilância para a Gripe Aviária em aves de capoeira e aves selvagens, aprovados pela Comissão Europeia.

Durante o ano de 2007, foram colhidas amostras representativas de explorações das várias espécies/categorias e das diversas Direcções de Serviços Veterinários Regionais / Regiões Autónomas do País, perfazendo um total de 7112 amostras em 775 explorações.

A amostragem foi realizada em todo o território nacional, tendo em conta o número de explorações a rastrear e o número de aves por exploração. O número de explorações a rastrear para cada categoria, foi determinado de forma a garantir a identificação de pelo menos uma exploração infectada para uma prevalência de 5% com um intervalo de confiança de 95% (99% em patos, gansos e perús). O número de aves a rastrear foi determinado de forma a garantir 95% de probabilidade de identificar pelo menos uma ave positiva para uma prevalência de 30%. No caso particular dos frangos de carne, só foram rastreadas as explorações, quando em risco. O plano de amostragem considerou os tipos de produção e seus riscos específicos, nomeadamente a localização das explorações dentro ou na periferia das zonas de risco e as explorações de regime ao ar livre.

Foram registados quatro focos de Gripe Aviária de Baixa Patogenicidade, todos do subtipo H5.

Em relação às aves selvagens, foi estabelecida uma cooperação estreita com epidemiologistas e ornitologistas e com o ICNB tendo atenção às rotas migratórias, populações de aves, habitats e resultados da vigilância dos anos anteriores.

A vigilância passiva foi efectuada em aves doentes ou mortas tendo como alvo áreas com aumento significativo de morbilidade e mortalidade em aves selvagens, áreas perto do mar, lagos ou charcos onde tenham sido encontradas aves mortas e aves pertencentes à lista identificada como de alto risco.

A vigilância activa foi efectuada em aves vivas, tendo como principal alvo as aves migradoras pertencentes às ordens dos Anseriformes e Charadriiformes, as áreas identificadas como de alta concentração e com elevado numero de aves migradoras e de múltiplas espécies, em especial na vizinhança de aviários e a selecção das espécies de alto risco.

Foram testadas 1887 aves selvagens em vigilância activa e passiva e registados 6 casos de baixa patogenicidade dos subtipos H5 e H7, todos eles em Anseriformes.

Em relação a 2008, estão apurados dados provisórios, tendo ocorrido um caso de baixa patogenicidade em Anseriformes durante o primeiro semestre.

Até à data, nunca foi detectado nenhum caso de Gripe Aviária de Alta Patogenicidade, quer em aves domésticas, quer em aves selvagens.

[Surveillance Program for Avian Influenza - Results from 2007 and 2008]

Portugal has been implementing surveillance programs for avian influenza in poultry and wild birds, approved by the European Commission since 2003.

During 2007, representative sampling from the different holdings species/categories and from the different Regions (DSVR/RA) were taken, in a total of 7112 samples from 775 establishments.

The sampling covered all the national territory, considering the number of holdings to be tested and the number of birds in each holding. The number of holdings to be tested was determined in order to detect at least one infected holding for a prevalence of 5% and a confidence level of 95% (99% in ducks, geese and turkeys). The number of birds to be tested was determined in order to detect one positive bird for a prevalence of 30% and a confidence level of 95%. For broilers, only holdings being at risk were tested. The sampling procedure took in consideration the different types of production and their specific risks, namely the location of holdings in or near the risk areas and the free range holdings.

Four outbreaks of Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) were detected; all of them of subtype H5.

Concerning the wild birds, a close cooperation was established with epidemiologists, ornithologists and with the National Institute of Conservation and Biodiversity (ICNB), considering the migratory routes, the wild birds' populations, their habitats and the surveillance results from previous years.

The passive surveillance was conducted in sick or dead birds, targeting areas with increased morbidity and mortality of wild birds, areas near the sea or ponds where dead birds were found and birds considered of high risk.

The active surveillance was conducted in live birds, specially targeting migratory birds from the orders Anseriformes and Charadriiformes, areas with high concentration of migratory and high risk species, particularly in the proximity of poultry holdings.

1887 wild birds were tested and six cases of LPAI of subtypes H5 and H7 were detected in Anseriformes.

Regarding 2008, provisional data is available and one case of LPAI in Anseriformes was detected during the first semester.

Until the present date, Highly Pathogenic Avian Influenza was never detected in poultry or wild birds.

Avaliação quantitativa do parasitismo intestinal em aves de produção

Monteiro, L.¹, Bica, A.², Mesquita, J.³, Marques, V.¹, Vala, H.³

1 Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

2 Médico Veterinário, Aviclasse, Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

3 Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

A Coccidiose é uma doença do tracto intestinal das aves, disseminada por todo o mundo, sendo uma das doenças mais importantes da avicultura industrial.

Esta doença é causada por microrganismos unicelulares do género *Eimeria*, os quais se multiplicam no tracto intestinal, indo propagar-se por todo o sistema digestivo. Como resultado, provocam danos ao nível dos tecidos, diminuindo a absorção dos nutrientes necessários ao seu correcto desenvolvimento. Este parasita é muito resistente, podendo viver de um ano para o outro no ambiente, sob uma forma passiva de resistência denominada ooquisto.

A Coccidiose surge, sobretudo, quando as aves jovens, mais desprotegidas, são infestados pela ingestão de grandes quantidades de ooquistos ou quando a imunidade das aves adultas é reduzida por factores causadores de stress. A infestação ocorre por via digestiva.

Neste trabalho foi realizado um estudo que incidiu sobretudo no método de observação microscópica, designadamente o método de Mc Master, um método quantitativo, que teve como objectivo a contagem de ovos/ooquistos usando as câmaras de contagem.

Nos três grupos de produção estudados verificou-se que esta doença se mantinha em níveis baixos. O Frango Industrial apresentava uma média de 400 ooquistos/g/fezes; o Frango do Campo 448 ooquistos g/fezes e nas Galinhas Reprodutoras uma média de 650 ooquistos g/fezes.

Este trabalho possibilitou a confirmação de que, apesar das medidas profiláticas implantadas nas explorações, esta doença permanece, ainda que em níveis de infestação baixos, podendo, em situações de desequilíbrio ou stress, vir a causar infestações elevadas, causadoras de perdas económicas.

[A Quantitative study on intestinal parasites in birds for human consumption]

Coccidiosis is an intestinal disease found in birds worldwide and one of the most important diseases in Industrial bird farming.

This disease is originated from microorganisms at a unicellular level of the genera *Eimeria*. These microorganisms multiply in the intestinal tract, making their way up to the digestive system.

As a result they produce tissue damages that diminishes the absorption of essential nutrients, necessary for healthy development and animal growth. This parasite is very resilient and is capable of living in the environment from one year to the other in a passive state called oocyst.

Coccidiosis arises primarily when young birds are in a vulnerable state for instance; infested by the ingestion of large amounts of oocysts or when under stress. Infestations occurs via digestive system.

The present work focused mainly on the method of microscopic observation – Mc Master method – a quantitative method that aimed on counting the number of eggs/oocysts using counting chambers.

In the three groups of production studied it was found that the disease remained at low levels. The Industrial Broiler revealed an average of 400 oocysts/g/feaces; open-air Chicken 448 oocysts/g/feaces and Breeding Chickens oocysts an average of 650 oocysts/g/feaces.

This work enabled the substantiation that despite the prophylactic measures implemented on farms this disease remains causative of economic losses. Despite the verified low levels of infestation in situations of stress or imbalance infestation will cause higher losses.

Caracterização de explorações industriais de suínos, em Portugal - resultados preliminares

Baptista, F.M.^{1,2}, Almeida, V.²

1 Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

As práticas de manejo e de biossegurança das explorações intensivas de suínos estão associadas à introdução e à manutenção de diversos agentes patogénicos que afectam a saúde “biológica” dos animais e a saúde “financeira” das explorações.

Está em curso um estudo epidemiológico transversal com o objectivo de caracterizar a fileira suinícola industrial em Portugal. Desde Setembro de 2008, foram distribuídos 250 questionários a 50 veterinários assistentes de explorações industriais de suínos, localizadas na Região de Lisboa e Vale do Tejo. O questionário reúne 77 questões e está dividido em 6 secções temáticas: características da exploração, indicadores produtivos, higiene, alimentação, manejo e sanidade. O questionário foi amplamente discutido com o grupo-alvo e as perguntas foram validadas numa amostra-piloto, o que conduziu à reformulação do questionário. Para diminuir a ocorrência de vieses nos resultados e para aumentar a taxa de resposta, a confidencialidade foi garantida e o objectivo do estudo foi exposto a todos por contacto pessoal ou telefónico.

Todos os dados foram codificados e introduzidos numa base de dados para armazenamento, validação e gestão de dados, e posterior análise estatística.

Esta informação permitirá categorizar as explorações em função do seu perfil produtivo e sanitário, bem como para o desenvolvimento de modelos de avaliação do risco de introdução e de transmissão de vários agentes patogénicos.

A caracterização deste sector contribuirá para ajustar as necessidades de assessoria técnica dos produtores, visando a redução de perdas económicas, a re-definição de estratégias preventivas e o futuro desenvolvimento de programas de certificação de garantia de qualidade.

Este poster reúne os resultados preliminares processados no período de Setembro a Novembro de 2008.

[Characterization of the industrial swine herds in Portugal – preliminary results]

The husbandry practices and the biosecurity of the industrial pig herds are strongly associated with the entry and the persistence of pathogenic agents that reduce the health of the animals and the “financial health” of the farms.

A national survey is going on to characterize the Portuguese sector of industrial pig farming. Since September 2008, 250 questionnaires were distributed to 50 veterinarians working for industrial pig herds located in the Region of Lisbon and Tagus Valley. The questionnaire assembles 77 questions and it is split into 6 main topics: farm characteristics, production parameters, hygiene, feed, husbandry and health. The questionnaire was discussed in detail with the target group and the questions were validated in a pilot trial that led to rearrangements of the questionnaire. To reduce the occurrence of bias in the results and to increase the response rate, confidentiality was assured and the aim of the survey was presented to all veterinarians involved either by a personal interview or by a phone call.

All data were coded and entered into a database for storing, validation, data management and statistical analysis.

The information generated will allow the categorization of the industrial pig herds according to their productive and sanitary profile, as well as, for the development of models of risk assessment for the entry and spread of several pathogenic agents.

This characterization of the industrial swine sector will help the veterinarians adjust their technical advises to pig farmers, focussing on the mitigation of production losses, the redesign of prevention strategies and the future development of quality assurance certification schemes.

This poster presents the preliminary results processed from September to November 2008.

Percepción de la importancia de las medidas de bioseguridad de las granjas de porcino

Simon, M., García, I., Casal, J.

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Edificio V, 08193Bellaterra, Barcelona

La implantación efectiva de las distintas medidas de bioseguridad en las granjas está condicionada por la importancia que les atribuyen los ganaderos y ésta normalmente está influida de forma crucial por la opinión de los veterinarios.

En el presente estudio se encuestaron un total de 118 ganaderos y 68 veterinarios responsables de explotaciones porcinas situadas en España. El cuestionario incluyó datos referentes a las medidas de bioseguridad consideradas más importantes por los ganaderos y veterinarios, así como una valoración, en una escala del 0 al 10, del nivel de bioseguridad que los encuestados atribuyeron a sus explotaciones. Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa SPSS v14.

La puntuación que los ganaderos atribuyeron al nivel de bioseguridad de sus explotaciones fue del 6.7 +/- 1.6. Por otra parte, los veterinarios calificaron con una puntuación inferior (5.4 +/- 1.6) el nivel de bioseguridad de las explotaciones que visitaban habitualmente.

Las medidas de bioseguridad relacionadas con el control de entrada de visitas y vehículos en sus explotaciones fueron consideradas como importantes tanto por granjeros como por veterinarios, mientras que las relacionadas con el estatus sanitario y la aplicación de cuarentena solo fueron destacadas por los veterinarios. El dato anterior resulta interesante si tenemos en cuenta que la introducción de nuevos animales en la granja es la forma más frecuente de entrada de nuevas enfermedades. (Manuel-León *et al* 2000., Amass i Clarck, 1998).

[Perception of importance of biosecurity measures on swine farms]

Effective application of different biosecurity measures in swine farms is determined by the importance that farmers attribute to them, and this fact is usually influenced by the opinion of the veterinarians.

In the present study, 118 farmers and 68 veterinarians responsible for swine farms located in Spain were questioned. Questionnaire included data related to the most relevant biosecurity measures according to farmers and veterinarians, as well as a biosecurity score, on a scale of 0-10. Statistical analyses were performed using SPSS package v14.

The mean score given by farmers to their biosecurity measures was 6.7 +/- 1.6. On the other hand, veterinarians gave a lower score (5.4 +/- 1.6), to the biosecurity measures of the farms they visited often.

The biosecurity measures related to the control of the entrance of people and vehicles to the farm were considered as important by both farmers and veterinarians, while those related to the health status and quarantine application in replacement stock were mentioned as relevant only by veterinarians. These results are interesting given that the introduction of animals in a farm is considered as the most common way for the introduction of new diseases. (Manuel-Leon *et al.* 2000., Amass and Clarck, 1998).

Encuesta seroepidemiológica de la toxoplasmosis porcina en Cataluña

García, I.¹, Simon-Grifé, M.¹, Cabezón, O.¹, Martín, G.¹, Almería, S.^{1,2}

¹ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

² Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

La toxoplasmosis es un zoonosis de distribución mundial producida por *Toxoplasma gondii*. Este protozoo ha sido hallado en más de 300 especies de sangre caliente incluido el hombre, siendo declarada por la OMS como una de las zoonosis parasitarias más importantes. El cerdo doméstico es considerado una importante fuente de transmisión de *T. gondii* en humanos a través del consumo de productos cárnicos no cocinados (Dubey and Beattie, 1988).

Durante el año 2008 hemos realizado una encuesta seroepidemiológica con el objeto de determinar la prevalencia de anticuerpos frente a *T. gondii* en explotaciones de ganado porcino de Cataluña.

A partir de 11 granjas de ganado porcino seleccionadas aleatoriamente, se obtuvieron 10 muestras de suero de animales de 3, 7, 11, 15 y 20 semanas así como 14 muestras de reproductoras y se cumplimentó un cuestionario epidemiológico. Las muestras fueron testadas para la detección de anticuerpos IgG mediante la técnica de aglutinación modificada (MAT, Dubey, 1997). Muestras con títulos superiores a 1:25 fueron consideradas positivas.

Del total de muestras analizadas (n= 544), 13.6% (95%IC: 10.7-16.5) resultaron positivas a la detección de anticuerpos frente a *T. gondii*. Todas las granjas tuvieron al menos un animal seropositivo. La seroprevalencia dentro de las explotaciones osciló entre el 1.6 y el 35.3%. La mayoría de las muestras positivas tuvieron títulos de 1:25 (54.8%), aunque también se detectaron animales con títulos de 1:50 (28.8%), 1:100 (12.3%) y 1:200 (4.1%).

Se encontraron diferencias significativas entre animales de diferentes edades (p<0.05). La frecuencia de seropositivos incrementó con la edad hasta la 15 semana, disminuyendo nuevamente a la 20 semana de vida. Sorprendentemente las menores frecuencias de animales positivos se observaron en hembras reproductoras (9.1%).

[Seroepidemiology survey of swine toxoplasmosis in Catalonia]

Toxoplasmosis is a worldwide distributed zoonosis, caused by *Toxoplasma gondii*. This protozoan has been found in more than 300 warm-blooded species including humans, and was declared by the WHO as one of the most common parasitic zoonoses. Domestic pigs are considered an important source of *T. gondii* for humans through consumption of uncooked infected meat (Dubey and Beattie, 1988).

During 2008 a seroepidemiological survey was carried out in order to determine the prevalence of antibodies against *T. gondii* in swine farms from Catalonia.

Ten serum samples from animals of three, seven, eleven, fifteen and twenty weeks of age, and fourteen of sows were taken from eleven swine farms randomly selected. Moreover, an epidemiological questionnaire was also filled out. The serum samples were tested for IgG antibodies to *T. gondii* using modified agglutination test (MAT, Dubey, 1997). Sera with a titer of 1:25 or greater were considered positive.

Of the total tested sera (n= 544), 3.6% (95%IC: 10.7-16.5) showed antibodies against *T. gondii*. All the farms had at least one seropositive animal. The within-farm seroprevalence ranged between 1.6 and 35.3%. Most of positive animals had titers of 1:25, although animals with titer of 1:50 (28.8%), 1:100 (12.3%) and 1:200 (4.1%) were also detected.

Statistically significant differences were observed among animals of different ages (p<0.05). The frequency of seropositive animals increased until the fifteenth week of age, then falling until the twentieth week of age. Surprisingly, the lowest frequencies of positive animals were detected in sows (9.1%).

Pesquisa de *Trichinella* sp. em suínos de algumas regiões do nordeste transmontano

Nóbrega, C.¹, Sousa, M.I.²

1 Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu

2 Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

A triquinelose é uma parasitose amplamente difundida a nível mundial, estimando-se que atinja actualmente 11 milhões de pessoas (Quiroz-Romero, 1988; Gajadhar e Gamble, 2000; Murrel e col., 2000). É transmitida pela ingestão de carne crua ou mal cozinhada contendo larvas de *Trichinella* sp. (Dupoy-Camet, 1991; Euzéby, 1997).

É uma zoonose re-emergente em muitas regiões do globo, especialmente na Europa, com maior incidência em Espanha e Países de Leste e também na América Latina e, emergente na Ásia (Dupoy-Camet, 2000; Ortega-Pierres e col., 2000; Takahashi e col., 2000; Liu e Boireau, 2002; Chávez-Larrea e col., 2005; Joshi e col. 2005; Ribicich e col., 2005).

O seu agente etiológico é conhecido desde o século XIX e pertence ao Filo Nematelminthes. Apresenta um leque de hospedeiros muito vasto que inclui animais domésticos, selvagens, homeotérmicos e poiquilotérmicos (Murrel e col., 2000; Pozio e col., 2002; Pozio, 2005).

Com este trabalho, em que foram avaliadas um total de 124 amostras de suínos do nordeste transmontano, pelo método de digestão artificial, pretende-se determinar o estado da triquinelose na região, bem como tecer algumas considerações no âmbito do manejo animal e de Saúde Pública.

[*Trichinella* sp. in pigs of northeast Portugal]

Trichinellosis is a widespread zoonosis, acquired by ingestion of undercooked meat containing larvae of the parasite *Trichinella* sp. and is estimated to affect 11 million people globally (Quiroz-Romero, 1988; Dupoy-Camet, 1991; Euzéby, 1997; Gajadhar e Gamble, 2000; Murrel e col., 2000).

This is a re-emerging disease in many countries in the world like Spain, East countries of Europe and Latin America. In Asia this is an emerging disease. The agent that causes this is a Nematode in the genus *Trichinella* that infect a broad range of domestic and sylvatic animals, homeothermic and poikilothermic ones (Dupoy-Camet, 2000; Ortega-Pierres e col., 2000; Takahashi e col., 2000; Liu e Boireau, 2002; Chávez-Larrea e col., 2005; Joshi e col. 2005; Ribicich e col., 2005).

In this work, they were assessed a total of 124 pig samples of northeastern Portugal. The authors intend to determine the status of trichinellosis in the region and make a few observations under the management of animal and public health.

Caracterização das explorações pecuárias no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, ilha de S. Miguel, Açores

Lima, R.¹, Vaz, Y.²

¹ Câmara Municipal de Nordeste, Açores

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

O objectivo do estudo foi caracterizar as explorações agrícolas no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho do Nordeste, com vista a identificar características de manejo favorecedoras da persistência de alguns agentes zoonóticos nos efectivos e assim auxiliar a tomada de decisões relativas à saúde animal.

Entre Novembro 2006 e Maio 2007 fez-se um questionário aos donos de 111 manadas, escolhidas aleatoriamente a partir da listagem fornecidas pelo SDASM. Os dados foram informatizados em Microsoft Excel e a análise estatística realizada neste programa, no SPSS v.15.0 e no StatCalc do EpiInfo2000.

A área total das explorações em estudo foi de 2259,87ha, com um efectivo de 5047 bovinos (2877 vacas). As áreas de pastagem variaram entre 0,85 e 70,12ha. O parcelamento das pastagens é elevado com a classe '21 a 50' parcelas sendo a mais frequente. O tamanho médio das parcelas é de 0,75ha, vestando localizadas em diferentes cotas de altitude. A densidade animal foi 2,6 animais/ha. Os tamanhos de manada variaram de 3 a 185 animais (média 45, DP 34). A média de vacas foi 26 (DP 20) por exploração, variando de 1 a 90 vacas. 57% das explorações apresentam cães, 47% têm caprinos e 1% ovelhas.

Utiliza-se o pastoreio directo e a conservação de alimentos é feita em silos de superfície e com fenação em rolos. São Oitenta e dois por cento dos vitelos são separados da mãe logo no 1º dia. Todos eles mamam colostro até aos 8 dias (média 5,6 dias, DP 2,2) e bebem leite de vaca até os três meses.

As novilhas em 64,8% das explorações pastam nas parcelas das terras altas, conjuntamente com as vacas secas e em 88,7% das explorações entram antes do parto no lote das vacas em

produção. A idade ao primeiro parto foi entre 24 e 30 meses em 86,9% das explorações. 68,5% das explorações fazem a inseminação artificial, 53% possuem touro e 15,3% pedem touros emprestados. Não existe diagnóstico de gestação sendo esta determinada pela ausência de cio. Os partos registaram-se ao longo do ano com valores máximos entre Dezembro e Maio. Apenas 3,6% dos produtores isolam as fêmeas e 17,1% não destroem as secundinas.

50% dos produtores compram fêmeas de reposição (20% adquirem novilhas). Estas são adquiridas em explorações, mas é também tradicional comprarem-se novilhas nas arrematações dos Impérios (17,1%). Cerca de 74% dos produtores vende os vitelos para viteiros e 64,0% para outras explorações. Em relação ao número de animais adultos vendidos, 75% tem como destino o matadouro, 18% outra exploração, 5% comerciantes e 2% são abatidos para autoconsumo.

[Characterization of farms in dairy farms in Nordeste, S.Miguel island, Azores]

The main goal of the study was characterize the dairy farms of the Nordeste County, in order to identify the characteristics and management practices possibly associated with the persistence of some zoonotic agents and thus to assist the decision making related to the animal health.

Between November 2006 and May 2007 a questionnaire was applied to the owners of 111 flocks, chosen randomly from the list supplied by the agriculture official services SDASM. The data have been entered in Microsoft Excel and the statistics analysis was performed in SPSS v.15.0 and the StatCalc of the EpiInfo2000.

The total area of the farms in study was of 2259,87 ha, with a total number of 5047 bovines (2877 cows). The pasture areas varied between 0,85 and 70,12 ha. The partition of the pastures is rather high with the rank "21 to 50" of the parcels being the most frequent. The average size of parcels is 0,75ha, being located in different quotas of altitude. Animal density was 2,6 animals/ha. The sizes of flocks had varied of 3 to 185 animals (average 45, SD 34). The average number of cows was 26 (SD 20) per farm, varying of 1 to 90 cows. In 57% of the farms dogs were present, in 47% goats and in 1% sheep.

Direct pasturing is used and the food conservation is made in surface silos and with hay-making in rolls. Saltpetre and fertilizer are used and drinking water comes from springs.

82% of the calves are separated of their mother soon in the 1º day. They all suck colostrum until 8 days (average 5,6 days, SD 2,2) and drink cow milk until three months of age.

The heifers in 64,8% of the farms graze in the parcels of high lands, jointly with the dry cows and in 88,7% of farms and they are moved to the lot of the cows in production before parturition. Age at the first calving was between 24 and 30 months in 86,9% of farms. Artificial insemination is used in 68,5% of farms, 53% have bulls and 15,3% borrow them. The only gestation diagnosis is made by the absence of heat. Calvings were recorded throughout the year with maximum values between December and May. Only 3,6% of the producers isolate the females and 17,1% do not destroy the placentas.

Replacement females are bought by 50% of the producers (20% acquire heifers). These are acquired in either farms, but it is also traditional to buy heifers in the Impérios' sales (17,1%). About 74% of the producers sell calves to suck-pens and 64,0% to other farms. In what concerns the number of sold adult animals, 75% have as destination the slaughter house, 18% another farm, 5% traders and 2% are slaughtered for self-consumption.

Seroprevalência da infecção por *Leptospira* spp. no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, São Miguel, Açores

Lima, R.¹, Benevides, S.², Flor, L.2, Vaz, Y.³

¹ Câmara Municipal do Nordeste, Açores

² DRDA-Laboratório Regional de Veterinária, Angra do Heroísmo, Açores

³ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

A leptospirose é uma doença de reconhecida importância em S.Miguel, Açores, tanto pela sua incidência na população humana como pelo seu impacto no sistema de produção de bovinos leiteiros. Os principais objectivos deste trabalho foram a determinação da seroprevalência desta doença nas explorações agrícolas leiteiras do concelho do Nordeste e o estudo das características do sistema de produção relacionadas com a ocorrência da infecção.

Foram colhidos 2153 soros de vacas em 118 explorações leiteiras, seleccionadas aleatoriamente de uma forma proporcional ao número de efectivos existentes em 3 classes de tamanho. Realizou-se um inquérito para avaliar as características do sistema de produção e as práticas de manejo. Para o diagnóstico serológico foi utilizada a técnica de aglutinação microscópica (TAM) na diluição mínima de 1:100, realizada no Laboratório Regional de Veterinária de Angra do Heroísmo. Foram testados 13 serovares e identificados 9, mas não foi possível fazer o estudo da seroprevalência do serovar Hardjo, por este requerer diluições mais baixas, embora fosse suspeito de estar presente em infecção endémica.

Das 2153 amostras de soro de vacas não vacinadas, 393 foram positivas (18,3%; IC95% 17,7 a 19,5%). A prevalência de explorações seropositivas foi de 61,1% (IC95% de 53,1 a 68,0%). O serogrupo Sejroe foi o mais importante por apresentar a seguinte seroprevalência de serovares: *saxkoebing* 67,9% e *wolffi* 0,5%. O segundo serogrupo mais frequente foi o Icterohaemorrhagiae com os serovares *icterohaemorrhagiae* 14,8% e *copenhageni* 8,4%. Depois foram os serogrupos: Autumnalis (serovar *autumnalis* 7,1%); Ballum (serovar *arborea* 7,1%); Australis (serovar *bratislava* 5,6%); Tarassovi (serovar *tarassovi* 1,8%) e Canicola (serovar *canicola* 1,8%). A coaglutinação com associação de *L. ballum arborea* e *L. autumnalis autumnalis* foi a que apresentou maior frequência, seguida da associação *L. icterohaemorrhagiae icterohaemorrhagiae* e *L. icterohaemorrhagiae copenhageni*.

Evidenciaram-se práticas estatisticamente associados à presença de animais seropositivos, nomeadamente: manadas conjuntas (OR 3,8), épocas de parto superiores a 9 meses (OR 4,8), compra de fêmeas (OR 3,2), quer a outros produtores (OR 2,5), quer a impérios (OR 6,3).

A elevada prevalência encontrada e os relativamente baixos níveis de higiene e biossegurança das explorações, assim como condições ambientais propícias à sobrevivência da *Leptospira* sp deveriam ser tomados em consideração para a avaliação da implementação de um programa vacinal nos bovinos contra esta zoonose.

[Evaluation of seroprevalence of Leptospirosis in dairy production system in Nordeste County of São Miguel Island, Azores]

Leptospirosis is an important disease in S. Miguel, Azores, due to the high incidence in the human population and also its impact on the dairy production system. The main goals of this work were to determine the herd and animal serological prevalence of antibodies of leptospirosis in the dairy herds of Nordeste county and to study the characteristics of the production system statistically associated with the presence of seropositive animals.

Serum samples of 2153 cows from 118 dairy herds were collected from November 2006 to May 2007, based on a random sample stratified proportionally by herd size. A questionnaire was performed to study the characteristics of production system. Serological diagnosis was performed at the Regional Veterinary Laboratory of Angra do Heroísmo using the Microscopic Agglutination Test (TAM) at the minimal dilution 1:100. Thirteen serovars were tested and 9 were identified but it was not possible to study the seroprevalence of serovar Hardjo, which is suspected to exist endemically in the region, because its diagnosis takes lower dilutions and more time was required than the available for the study.

From the 2153 serum samples of non-vaccinated cows tested, 393 were positive (18.3%; CI95% 17.0-19.5%). Seroprevalence of positive farms were 61.1% (CI95% 53.1-68.0%). The serogroup Sejroe, the most important, presented the following seroprevalence of serovars: *saxkoebing* 67.9% and *wolffi* 0.5%. The second most important serogroup was the Icterohaemorrhagiae with the serovars *icterohaemorrhagiae* 14.8% and the *copenhageni* 8.4%. Other serogroups were found: Autumnalis (serovar *autumnalis* 7.1%); Ballum (serovar *arborea* 7.1%); Australis (serovar *bratislava* 5.6%); Tarassovi (serovar *tarassovi* 1.8%) and Canicola (serovar *canicola* 1.8%). The coagglutination with association of *L. ballum arborea* and *L. autumnalis autumnalis* was the more frequent, followed by the association *L. icterohaemorrhagiae icterohaemorrhagiae* and *L. icterohaemorrhagiae copenhageni*.

The study of the production system identified several characteristics and management practices statistically associated with the presence of seropositive animals. They were: joint herds (OR 3.8), parturitions during more than 9 months (OR 4.8), purchase of females (OR 3.2), from other producers (OR 2.5), or from the “impérios” (religious institutions) (OR 6.3).

The high seroprevalence of the disease and the relativity low levels of hygiene and biosecurity of farms, as well as the environmental conditions suitable for the survival of *Leptospira* sp, should be taken into account to evaluate the implementation of a program of bovine vaccination against this zoonosis.

Diagnóstico serológico da *Chlamydophila abortus* em bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, ilha de S. Miguel, Açores

Lima, R.¹, Benevides, S.², Flor, L.², Vaz, Y.³

1 Câmara Municipal do Nordeste, Açores

2 DRDA-Laboratório Regional de Veterinária, Angra do Heroísmo, Açores

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

O estudo teve como objectivo a pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydophila abortus* em soro sanguíneo de vacas e a associação às características do sistema de produção que possam favorecer a sua disseminação e manutenção.

Foram colhidos 2153 soros de vacas em 111 explorações leiteiras, seleccionadas aleatoriamente de uma forma proporcional ao número de efectivos existentes em 3 classes de tamanho. Realizou-se ainda um inquérito às características do sistema de produção.

A pesquisa e anticorpos foi realizada pela técnica de ELISA indirecto com o kit comercial Ruminants Serum Chlamydiosis da marca LSI (Laboratoire Service Internacional) Lissieu, França, no Laboratório Regional de Veterinária de Angra do Heroísmo. Os resultados foram obtidos de acordo com as fórmulas propostas pelas instruções do fabricante.

Das 2153 amostras analisadas 303 eram positivas (14,0%; IC95% 12,9 a 15,1%). Nas 111 manadas submetidas ao estudo foi encontrada em 92 pelo menos 1 animal seropositivo a organismos da ordem Chlamydiales (82,9% prevalência; IC95% 76,7 a 89,1%).

As prevalências individuais nas 92 explorações positivas foram analisadas, resultando numa média de 16,6% (DP 12,8%), variando entre os 5 e os 100% (esta com 1 animal). As prevalências dentro de exploração mais frequentes estão na classe 5-10%, seguindo-se as classes até aos 20% de animais positivos por exploração.

As características da exploração estatisticamente associados à presença de animais seropositivos foram a época de partos superior a 9 meses (OR 3,4), a existência de problemas de metrites (OR 10,3) e de mastites (OR 6,1).

Não é possível estabelecer com garantia o estatuto sanitário das explorações relativas a esta doença, apenas a partir dos resultados serológicos obtidos numa colheita, realizada em estudo transversal, mas verifica-se que a clamidiose se encontra muito disseminada no concelho do Nordeste e apresenta títulos positivos em baixa proporção de animais em cada exploração, num cenário de endemicidade e adaptação. É importante melhorar o isolamento de fêmeas durante o parto e os cuidados de higiene como a destruição de placentas, camas e fetos mortos. Será necessário melhorar a protecção pessoal dos tratadores e tomar em consideração a possibilidade de vacinação em surtos de aborto enzoótico por *C. abortus*.

[Serological Diagnosis of *Chlamydophila abortus* in dairy production system in Nordeste county, S. Miguel Island, Azores]

The main goals of this study were to determine the herd and animal serological prevalence of antibodies of *Chlamydophila abortus* in the dairy herds of Nordeste County and to study the characteristics of the production system and management practices statistically associated with the presence of seropositive animals.

Serum samples from 2153 sera of cows from 111 dairy herds were collected from November 2006 to May 2007, in a random sample of herds stratified proportionally by size. A questionnaire was carried out to study the farm practices and characteristics of the production system.

An indirect ELISA was used for the detection of antibodies anti-*Chlamydophila abortus*, using the commercial kit Ruminants Serum Chlamydiosis, LSI (Laboratoire Service Internacional) Lissieu, France, from the Regional Veterinary Laboratory of Angra do Heroísmo.

Prevalence of positive samples was 14.0% (IC95% 12.9 -15.1%). Herd prevalence was 82.9% (CI95% 76.7-89.1%), considering the presence of one positive animal as a positive herd. Inside herd prevalence in the 92 positive herds was 16.6% (DP 12.8%), varying between 5 and 100% (the last was a farm with 1 animal). The most frequent class for herd prevalence was 5-10%, followed by class 10-20%.

The characteristics of farming statistically associated to the disease were: the duration of parturitions for more than 9 months (OR 3.4), problems of merits (OR 10.3) and mastitis (OR 6.1).

It is not possible to establish a disease classification for the tested farms, based on one survey and without a history, but clamidiosis is much disseminated in the council of Nordeste showing positive titles in a low proportion of the animals in each herd revealing a scenario of endemicity and adaptation. It will be important to improve the isolation of females at the parturition and hygienic care (destruction of placenta, beds, and dead fetuses), to improve personnel protection practices and consider vaccination against *C. abortus* in case of enzootic abortion.

Estudio de seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en la cabaña bovina de Extremadura (España suroccidental) y papel del ciervo (*Cervus elaphus*) en su epidemiología

García, A.¹, Galán, L.², Morales, J.², Castillo, L.³, Bermejo, F.³, Hermoso de Mendoza, J.³, Gutiérrez, JL.², Merchán, J.², Alonso, J.M.³

1 Producción Animal, Centro de Investigación Finca La Orden-Valdesequera, Junta de Extremadura

2 Laboratorio Regional de Sanidad Animal, Junta de Extremadura

3 Red de Investigación de Recursos Faunísticos, Patología Infecciosa y Epidemiología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres

La paratuberculosis (PTB) es uno de los principales problemas sanitarios del ganado a nivel mundial, responsable de cuantiosas pérdidas económicas. Aunque la PTB ha sido señalada previamente en el ganado bovino de Extremadura (España suroccidental), no se han desarrollado estudios para conocer su prevalencia ni programas de control.

En este estudio, sueros bovinos (n= 1864) de ambas provincias extremeñas (Cáceres n=1144 y Badajoz n=720), fueron examinados mediante un kit comercial ELISA para determinar la seroprevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (Map). En el conjunto de la población la media de seroprevalencia fue del 1,23%. Además 100 muestras de tejidos de animales sacrificados en matadero (válvula ileocecal y ganglios linfáticos cecales) fueron investigadas con técnicas bacteriológicas obteniendo resultados negativos. Nuestros datos indican que Map presenta una baja prevalencia en el ganado bovino extremeño, no existiendo diferencias significativas entre las 2 provincias ni variaciones regionales reseñables.

El ganado bovino en Extremadura, criado en extensivo, comparte hábitat con animales de vida libre como el ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*), el mayor artiodáctilo salvaje de la zona, por lo que decidimos ampliar el estudio a ciervos salvajes para establecer su potencial papel epidemiológico como reservorio de la infección, como se ha establecido previamente para la tuberculosis bovina. Muestras de tejidos y heces de 250 ciervos cazados fueron sometidas a cultivo y en sueros de 463 animales se investigó la presencia de anticuerpos frente a Map. Sólo 2 de los sueros examinados resultaron positivos (0,43%) y los resultados de los cultivos fueron negativos. De acuerdo con estos resultados, el ciervo no parece desempeñar un papel relevante como reservorio en la epidemiología de Map bovino en la región.

[Seroprevalence study of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bovine population of Extremadura (South-western Spain) and role of red deer (*Cervus elaphus*) in its epidemiology]

Paratuberculosis (PTB) is a major livestock disease problem worldwide, and causes important economic losses. Although PTB has been reported in bovine of Extremadura (South-western Spain), no studies have been conducted to determine its prevalence and no program has been developed to control the disease.

In this study, cattle sera (n= 1864) from the two Extremadura provinces (Cáceres n=1144 and Badajoz n=720), were analyzed by a commercial ELISA kit to assess the seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map). The average seroprevalence in the whole cattle population was estimated to be 1,23%. In addition 100 fresh tissue samples including ileocecal junction and cecal lymph nodes from slaughtered cattle were analyzed by bacteriology with negative results. Our finding indicates that Map has low prevalence among cattle population in Extremadura, neither existing statistically significant differences between the two provinces nor important regional variation.

Domestic cattle in Extremadura, extensively reared, share habitat with wild animals like red deer (*Cervus elephus hispanicus*), the main wild artiodactyls in the area, so that it was decided to extend the survey in free-ranging cervids to establish its possible role as reservoirs of the infection, as previously have been described in bovine tuberculosis. Tissue samples and feces from 250 hunted red deer were cultured and the sera from 463 were screened for the presence of antibodies against Map. Only two serum tested positive (0.43%) and no positive cultures were obtained. According to this results red deer do not play an important role in the epidemiology of bovine Map in the region.

La vacunación frente a paratuberculosis con una vacuna inactivada por calor no interfiere en el diagnóstico de la tuberculosis bovina

Juste, R.A., Alonso, M., Molina, E., Geijo, M.V., Vazquez, P., Gomez, N., Fuentes, M., Sevilla, I., Garrido, J.M.

INEIKER-Tecnalia. Berreaga 1, 48160 Derio (Bizkaia)

La paratuberculosis o enfermedad de Johne produce una inflamación granulomatosa en el intestino delgado de los rumiantes y es causada por *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Map). En este trabajo se evalúa la eficacia de una vacuna inactivada por calor (Silirum®, CZV, Spain) frente a la infección por Map en cinco explotaciones de ganado bovino lechero libres de tuberculosis. Como control se implantó un programa de detección y eliminación de positivos basado en el ELISA de sangre y PCR de heces de un rebaño no vacunado. El impacto de la vacunación en los resultados de la intradermorreacción frente a *M. bovis*, la tasa de anticuerpos frente a Map, el nivel de excreción fecal, el grado de mortalidad y de desvieje, así como la aparición de síntomas clínicos y el tipo de lesiones histopatológicas observadas fueron analizadas durante un periodo de dos años. La vacuna no provocó lesiones relevantes en el punto de inoculación. Sólo un reducido número de animales (1%) presentó nódulos calificados como grandes (>7,5 cm de diametro) un año post-vacunación. Dos años después de instaurarse el programa de control mediante vacunación, la prevalencia de eliminadores se redujo cerca del 100% en tres de las cinco explotaciones vacunadas y teniendo en cuenta todas las explotaciones en conjunto la cantidad total de Map eliminada y detectada mediante PCR a Tiempo Real fue menor en las explotaciones vacunadas (92%) que en la control (78%). Tras la vacunación sólo se registraron cuatro casos clínicos entre las cuatro explotaciones de raza Frisona y otros cuatro en la única explotación de raza Jersey. Habría que tener en cuenta que esta última raza es más susceptible y que las condiciones higiénicas de esta explotación eran extremadamente malas. En general, se observó un descenso de la mortalidad del 14% entre los animales del grupo 2,5-4,5 años. Además la vacunación redujo un 46% el número de animales sacrificados con síntomas de la enfermedad con resultados positivos en las pruebas histopatológicas. Se redujo un 78 y un 49% la presencia de la bacteria en las heces o en el tejido intestinal de los animales sacrificados y también se redujo el grado de las lesiones observadas. Sólo uno de los animales vacunados reaccionó a la IDR comparativa, lo que puso de manifiesto el escaso nivel de interferencia de la vacunación con el diagnóstico de la tuberculosis bovina si se utilizan las pruebas adecuadas. En definitiva, puede concluirse que al vacunación puede ser una herramienta muy eficaz para el control de las pérdidas por paratuberculosis en vacuno, al igual que lo hace en ovino.

[Effective vaccination against paratuberculosis with a heat-killed vaccine does not compromise the diagnosis of bovine tuberculosis]

Johne's disease or paratuberculosis is a chronic granulomatous inflammation of the small intestine of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map). Here, we evaluate the efficacy of a heat-killed vaccine (Silirum®, CZV, Spain) against Map infection in five tuberculosis-free farms of dairy cows. As control, a test and cull program was implemented in an unvaccinated farm. The impact of vaccination on skin-test responses to *M. bovis*, Map serum antibodies, faecal shedding of Map, mortality rate, culling rate and on the development of clinical signs and lesions characteristics of paratuberculosis was examined during a 2-year clinical trial. The vaccine did not cause significant lesions at the site of injection since only a small number of vaccinated cows (1%) showed large nodules (diameter larger than 7.5 cm) at 1 year p.v. After two years of the implementation of the vaccination program, the prevalence of shedders was reduced by nearly 100% in three of the five vaccinated farms, and the total amount of Map shed onto pasture was also reduced in the vaccinated farms when compared with the control farm. After vaccination clinical paratuberculosis was diagnosed only in 4 Holstein cows and in 4 Jersey cows. We have to take into account that the Jersey breed is more susceptible and that the hygiene practices of this farm were deficient. In general a reduction of a 14% in the overall mortality was observed of the 2.5-4.5 years old animals. Also vaccination reduced 46% the frequency of culled animals with clinical signs of the disease or with a positive histological test result. It limited to 78% and to 49% the presence of bacteria in the culled cattle faeces and intestinal tissues, respectively, and reduced significantly the severity of the lesions. Since just one of the vaccinated animals showed a positive skin-test reactivity, it can be concluded that immunization against paratuberculosis did not seriously compromise bovine tuberculosis detection when the adequate test was used. In summary, our results supports the view that vaccination could be a suitable tool for the control of losses by paratuberculosis in cattle as much as it does in sheep.

Seroprevalencia de *Coxiella burnetii* en rumiantes domesticos en pastoreo semi-extensivo del norte de España

Astobiza, I., Ruiz-Fons, J.F., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L.

NEIKER-Tecnalia, Berreaga 1, 48160 Derio (Bizkaia)

La fiebre Q es una zoonosis causada por *Coxiella burnetii*, endémica en el norte de España, donde se ha observado un alto porcentaje de neumonías en la especie humana asociadas a esta bacteria. Los rumiantes están considerados como la principal fuente de infección. Un estudio retrospectivo realizado en esta misma área geográfica mostró que un 9% de los abortos ovinos eran debidos a *C. burnetii* poniendo en evidencia la importancia del ganado ovino como reservorio en la transmisión de la enfermedad. También se ha descrito que tanto el ganado vacuno como el ganado caprino pueden ser fuentes de infección de fiebre Q en humana. El objetivo de un proyecto actualmente en marcha es estudiar el ciclo doméstico y silvestre de la fiebre Q en el País Vasco (norte de España). Así, respecto al estudio en especies domésticas, en esta comunicación se presentan los resultados de seroprevalencia en ganado bovino de carne, ovino y caprino, que realizan un manejo de tipo semi-extensivo con largos periodos del año en zonas de monte. En primer lugar, se tuvieron en cuenta los censos ganaderos de las diferentes especies y se calculó el tamaño de muestra a tomar en cada comarca geográfica según un muestreo de tipo probabilístico por conglomerados en 2 etapas, seleccionando rebaños por afijación proporcional y animales por muestreo aleatorio simple, estableciendo un máximo de 100 explotaciones y un total de 2000 animales a estudiar. El estudio de anticuerpos frente a *C. burnetii* se realizó mediante la técnica del ELISA (LSI Fiebre Q Ruminants) en sueros de 626 bovinos, 1379 ovejas y 115 cabras, de 42, 46 y 11 explotaciones respectivamente, muestreadas entre los meses de octubre de 2007 y abril de 2008. La seroprevalencia individual fue de 16.8% para la especie ovina, 6.7% para la especie bovina y 8.7% para la caprina. Por explotaciones, se observó que un 73.9% de los de los rebaños ovinos tenían al menos un animal seropositivo, mientras que las cifras de prevalencia en explotaciones bovinas y caprinas fueron inferiores (41.9% de las bovinas y 45.5% de las explotaciones caprinas). El 15.0% de los rebaños ovinos y el 7.14% de las explotaciones bovinas presentaron una seroprevalencia $\geq 25\%$. En caprino, 6 explotaciones resultaron negativas (6/11, 54%) y el resto (5) presentó seroprevalencias entre 10-30%. Estos datos confirman la importancia de la especie ovina como principal fuente de transmisión de *C. burnetii* en la CAPV, aunque también se tiene que tener en consideración a las especies tanto bovina como caprina. En la actualidad se están analizando muestras de fauna silvestre para estudiar la posible interacción entre especies domésticas de manejo extensivo y especies silvestres en el ciclo de Fiebre Q. Estudio financiado por: INIA FAU 2006-00002-C04-01.

[Study of the seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in semi-extensive grazing system from northern Spain]

Q fever, a worldwide zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii*, is endemic in Northern of Spain, where numerous cases of pneumonia associated to this bacterium have been described in humans. Ruminants are considered the main source of infection for humans. A retrospective study carried out in this area showed that 9% of the ovine abortions were due to *C. burnetii*, revealing the importance of ovine flocks as reservoirs of the disease. Other domestic species like bovine and caprine have been also described as sources for human Q fever outbreaks elsewhere. In the frame of a larger project aimed at investigating the characteristics of the domestic and wild cycles of *C. burnetii* in the Basque Country (Northern Spain) and their interactions, a seroprevalence study was carried out in domestic species in semi-extensive grazing systems in the Basque Country. Presence of antibodies was studied in serum samples collected from October 2007 to April 2008 by ELISA test (ELISA Cox kit, LSI) according to the manufacturer's instructions. Firstly, census data were compiled for sheep, goat and beef cattle and then, sample size was calculated according to the proportion of flocks within the study area and individuals were randomly selected within flocks, with a maximum number of 100 herds/flocks and 2000 animals. A total of 626 beef cattle, 1379 sheep and 115 goats, from 42, 46 and 11 herds/flocks, respectively, were investigated. Seroprevalence was higher in sheep (16.8%) than in goats (8.7%) and beef cattle (6.7%). Flock seroprevalence (flocks with at least one seropositive animal) was 73.9% (34/46) for ovine flocks, 45.5% (5/11) for goat herds and finally, 41.9% (18/43) for bovine herds. Fifteen percent of ovine flocks and 7.1% of bovine herds had $\geq 25\%$ of seropositive animals. In goats, the five seropositive herds showed seroprevalences between 10 and 30%. These results suggest sheep as the main source for *C. burnetii* infection in the Basque Country, but indicate that bovine and caprine species also represent potentially important sources that need to be taken into account. Analysis of wildlife samples, currently in progress, will provide further data to investigate possible interactions between domestic and wild species in *C. burnetii* cycle in nature.

Funding: INIA, FAU2006-00002-C04-01

Rastreo serológico de Febre Q em ovinos no concelho de Montemor-o-Novo

Fernandes, A.C.¹, Oliveira, M.², Carneiro, C.², Manteca, C.¹, Vilela, C.L.²

¹ Ceva Phylaxia

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Foi realizado um rastreo para determinar a seroprevalência do agente da Febre Q, *Coxiella burnetii*, nos rebanhos de ovinos do concelho de Montemor-o-Novo, de forma a: i) calcular prevalência de explorações positivas; ii) a prevalência animal por exploração.

Foi seleccionada uma amostra aleatória de 35 explorações, num total de 726 animais, aos quais foram recolhidas amostras de sangue para serem analisadas através de um teste de ELISA comercial para detecção de anticorpos anti *C. burnetii* em fase I e fase II. Foram identificadas 20 explorações (57,1%) com pelo menos um animal positivo. A prevalência intra-exploração variou entre 3% e 50%.

Os estudos epidemiológicos e a investigação sobre surtos ocorridos nos últimos anos em vários países da Europa mostram que a Febre Q deve ser considerada um problema de saúde pública crescente, sendo os ruminantes identificados como a principal fonte de infecção para o Homem.

O conhecimento desta zoonose através de estudos seroepidemiológicos é um passo inicial importante para o seu controlo em Portugal, uma vez que a existência de casos humanos indica a presença do agente no nosso País, mas são escassos os dados relativos à sua ocorrência em espécies animais.

[Serological survey of Q fever in sheep in the Montemor-o-Novo district]

A survey on seroprevalence of Q fever agent, *Coxiella burnetii*, in sheep flocks in the Montemor-o-Novo district was performed in order to: i) estimate the prevalence of positive flocks; ii) the animal prevalence within the flock .

Thirty-five flocks were randomly selected, comprising a total of 726 sheep. Blood samples were collected to be tested by an ELISA commercial kit for the detection of phase I and phase II anti-*C. burnetii* antibodies. Twenty flocks (57.1%) were identified with at least one positive animal. The prevalence within the flocks ranged between 3% and 50%.

The epidemiological surveys and the investigation of outbreaks that occurred in the last years in several European countries show that Q fever must be considered an increasing public health concern, being the ruminants identified as the main source of infection for Man.

The study of this zoonosis through seroepidemiological survey is an important step for its control in Portugal because, although human cases indicate that the agent is present in the country, data on animal disease are scarce.

Observaciones sobre los primeros focos de Lengua Azul serotipo 1 en Cataluña

Allepuz, A.^{1,2}, Pujols, J.^{1,3}, Garcia, I.¹, Lopez, S.¹, Selga, I.⁴, Rosell, R.^{1,4}, Molleda, M.⁴, Panadès, J.⁴, Turó, M.⁴, Gou, J.⁴, Domingo, M.^{1,2}

1 Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

2 Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

3 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona

4 Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Barcelona

La situación epidemiológica de la lengua azul (LA) en España ha experimentado un cambio sustancial tras la introducción del serotipo 1 en julio de 2007. Durante los meses posteriores, el virus se extendió rápidamente confirmándose un total de 7974 focos en el año 2007 y 1427 durante el presente año (RASVE, 2008).

En Cataluña, el primer foco de LA serotipo 1 fue declarado el 19 de septiembre de 2008 en una explotación de ganado ovino de la comarca de la Garrotxa. A fecha 9 de octubre se han visto afectadas 62 explotaciones distribuidas en un total de 10 comarcas. La mayoría de los focos han sido confirmados en explotaciones de ovino (77.4%, 48/62), aunque también se han detectados casos sin signos de lengua azul en explotaciones de bovino (3), caprino (1) y explotaciones con presencia de ovinos y caprinos (10), analizados aleatoriamente o por su relación con los brotes en ovino.

Se realizó un cuestionario epidemiológico mediante entrevista personal en 9 de las primeras granjas de ovino afectadas. El número de animales con signos clínicos se mantuvo entre el 5 y el 25% ($\mu=15\pm 10$); siendo la mortalidad de un 2 a un 12% ($\mu=7\pm 5$) y la letalidad de un 41 a un 67% ($\mu=54\pm 13$). Todos los animales afectados fueron animales mayores de 2 meses y el periodo de evolución de la infección dentro del rebaño (entre el primer y último animal con sintomatología clínica) osciló entre 19 y 35 días ($\mu=27\pm 8$). En todas las explotaciones visitadas los ganaderos habían observado en los animales cansancio, apatía, y edema facial. Otros signos frecuentemente observados fueron, secreción nasal, edema auricular, salivación y rigidez de las extremidades en el 87% (7/8), postración y disnea en el 75% (6/8) así como conjuntivitis y cojeras en el 62% de las explotaciones (5/8).

Los primeros signos clínicos podrían haber sido detectados por los ganaderos entre 13 a 26 días antes de la comunicación oficial de los primeros casos y habrían sido atribuidos a causas inespecíficas hasta que el número de afectados y bajas aumentó de forma consistente. Aunque en muchos casos la vacuna se aplicó cuando ya se había detectado la clínica compatible, cabe destacar que la vacunación fue valorada como una medida eficaz en el control de la enfermedad en la granja por la mayor parte de los ganaderos entrevistados 78% (7/9). Finalmente, la valoración de la eficacia de la vacunación podrá ser evaluada cuando se disponga de una mayor información sobre el grado de cobertura vacunal y la disminución de nuevos brotes.

[Observations on the first outbreaks of Blue Tongue serotype 1 in Catalonia]

The epidemiological situation of bluetongue (BT) in Spain has experienced a substantial change after the introduction of serotype 1 in July 2007. During the following months, the virus spread quickly. During 2007, 7,974 outbreaks were detected and in the current year a total of 1,427 have been confirmed (RASVE, 2008).

In Catalonia, the first outbreak of BT serotype 1 was detected on September 19th, 2008 in an ovine farm of the region of the Garrotxa. Until October 9th, 62 farms have been affected over a total of 10 counties. Most outbreaks have been confirmed on ovine farms (77.4%, 48/62) and others have been detected in farms without clinical signs; cattle farms (3), goat farms (1) and farms with sheep and goats (10). These farms were tested because of an epidemiological relation with an outbreak in an ovine farm or because of random sampling. An epidemiological questionnaire was conducted by interviewing staff in 9 first affected ovine farms. The number of animals with clinical signs by farm ranged between 5 and 25% ($\mu = 15\pm 10$), showing a mortality rate of 2 to 12% ($\mu = 7\pm 5$) and a lethality of 41 to 67% ($\mu = 54\pm 13$). All the affected animals were older than 2 months and the period of evolution of the infection within the herd (between the first and last animal with clinical symptoms) ranged from 19 to 35 days ($\mu = 27\pm 8$). In all the visited farms the owners observed apathy, tiredness and facial oedema in their animals. Other frequently observed signs were ear oedema, salivation, nasal discharge and rigidity of the limbs in 87% (7/8), prostration and dyspnoea in 75% (6/8) as well as conjunctivitis and lameness in 62% of the holdings (5/8).

The first clinical signs could have been detected by farmers between 13 to 26 days before the official communication of the first cases. These clinical signs were attributed to unspecified causes until the number of affected and dead animals increased consistently. Although in many cases the vaccine was applied after the appearance of clinical signs compatible with BT, it should be noted that vaccination has been rated as an effective measure in controlling the disease at farm level by most of the interviewed farmers 78% (7/9). Finally, the effectiveness of vaccination will be assessable when more information about the level of vaccination coverage and the decline of new outbreaks will be available.

Diferentes abordagens para o estudo dos vectores da Língua Azul pertencentes ao complexo *C. obsoletus* e *C. dewulfi* em Portugal

Diaz, S., Alexandre-Pires, G., Meireles, J., Boinas, F., Pereira da Fonseca, I.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Introdução: Os insectos do género *Culicoides* são vectores biológicos do vírus da Língua Azul (LA), um arbovirus (Reoviridae: Orbivirus) transmitido pelas fêmeas infectadas quando realizam as suas refeições sanguíneas. Na Europa consideram-se as espécies dos complexos *Culicoides imicola*, *C. obsoletus* e *C. pulicaris* como as principais vectoras do vírus da LA. De modo a identificar as espécies do complexo *Culicoides obsoletus* (capturadas no âmbito do programa nacional de vigilância entomológica, entre Maio de 2005 e Outubro de 2008), realizaram-se estudos moleculares (PCR multiplex) e estudos de microscopia electrónica de varredura (MEV).

Material e métodos: PCR – A extração de DNA foi realizada individualmente utilizando o kit DNeasy Tissue (Qiagen, Crawley, UK), em 381 espécimes seleccionados aleatoriamente. O PCR multiplex foi realizado de acordo com Nolan *et al.* (2007).

MEV – Fêmeas e machos do complexo *C. obsoletus* foram desidratados utilizando o método do ponto crítico. Após o revestimento com ouro paladium foram observados num microscópio electrónico JEOL.

Resultados e considerações: PCR multiplex – Esta técnica permitiu, até ao momento, a identificação de 361 espécimes pertencentes à espécie *C. obsoletus* s.s.. Os restantes vinte exemplares continuam em estudo devido a resultados inconclusivos.

MEV – Imagens da cabeça (detalhes dos olhos, flagelómeros de sensilla, ausência de ornamentação cibarial e faríngea, peças bucais e palpos maxilares), tórax, abdómen, patas (pente tibial e 5º tarsómero com unhas e empódio) e genitálias são apresentadas.

Considerando que algumas espécies tais como as pertencentes ao complexo *C. obsoletus* e à espécie *C. dewulfi* têm muitas semelhanças morfológicas e são actualmente consideradas vectoras do serótipo 8 da LA, a caracterização molecular constitui uma ferramenta muito útil para as diferenciar, contribuindo para a determinação da sua distribuição espacial e para o estabelecimento de medidas de controlo da LA.

Os aspectos morfológicos mostram-se importantes para a caracterização das espécies de *Culicoides*, contribuindo para a identificação taxonómica das mesmas. Por outro lado, tais características são um contributo para um melhor conhecimento biológico das espécies, permitindo inferir, por exemplo, quanto às preferências alimentares.

[Different approaches for the study of the blue tongue vectors *C. obsoletus* complex and *C. dewulfi* in Portugal]

Introduction: *Culicoides* are the biological vectors of Bluetongue virus (BTV), an arbovirus (Reoviridae: Orbivirus) that is transmitted by the females when they feed on viraemic animals. In Europe the main BTV vectors are considered to be species of complexes *Culicoides imicola*, *C. obsoletus* and *C. pulicaris*. In order to improve the identification of species of *Culicoides obsoletus* complex (captured during the national program of entomological survey in Portugal, between May 2005 and October 2008), polymerase chain reaction (PCR) and Scanning Electronic Microscopy (SEM) studies were performed.

Material and methods: PCR multiplex - Total DNA was extracted from 381 individual specimens with random selection using DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Crawley, UK). The PCR's were performed according to the diagnostic multiplex PCR assay described by Nolan *et al.* (2007).

SEM - Female and male specimens of *C. obsoletus* complex were dried using point drying method and coated with gold palladium and observed in a JEOL – electronic microscope.

Results and remarks: PCR – This technique allowed the identification of 361 individual specimens of *C. obsoletus* s.s.. Twenty of them are still being processed due to unclear results.

SEM - Images of head (details of the eyes, sensilla flagellomeres, absence of teeth in cibarial arch and pharynx, maxillary palps and mouth parts), thorax, abdomen, legs (hind tibial comb and 5th tarsi with empodium claws) and genitalia are presented.

Considering that some species like those of *C. obsoletus* complex and *C. dewulfi* have several morphological similarities and are actually considered vectors of BTV 8 serotype, molecular characterization can be a useful tool to differentiate them, to evaluate its spatial distribution as well as the establishment of control measures for BTV.

Morphological aspects are important in the characterization of *Culicoides* species and contribute to its taxonomic identification. On the other side these morphological features allow us to know better the biology of these species and may contribute to explain feeding preferences.

Parasitismo em ruminantes do concelho de Coruche (Portugal)

Rosa, F.¹, Crespo, M.², Mariano, P.², Cipriano, J.M.³

1 Instituto de Investigação Científica Tropical/JBT, Rua da Junqueira, 14, 1300-343 Lisboa; fhjrosa@gmail.com

2 Escola Superior Agrária/Instituto Politécnico de Santarém, Apartado 310-2001 904 Santarém

3 Organização de Produtores Pecuários de Coruche, Vale do Sorraia e Salvaterra de Magos, Rua de S. Pedro, 19, 2100-164 Coruche

Entre Março e Agosto de 2007 efectuou-se um estudo parasitológico em efectivos bovinos de raças de carne e Brava e ovinos de raça Merino Branco do Concelho de Coruche, explorados em regime extensivo e sujeitos a um programa profilático para helmintes e ectoparasitas, visando a determinação das principais helmintoses presentes.

Nas oito freguesias do concelho e de acordo com o número de explorações/número de animais, colheu-se um total de 206 amostras de fezes em bovinos de carne, 30 em bovinos de raça Brava e 71 em ovinos. As amostras foram sujeitas a análises coprológicas, com base em métodos qualitativos e quantitativos (técnicas de Willis, de sedimentação e de McMaster).

Em seis das explorações onde se detectou *Fasciola hepatica*, procedeu-se à prospecção dos biótopos do molusco hospedeiro intermediário (HI).

A eliminação de ovos, oocistos e/ou larvas de primeiro estadio (L1), foi registada em 53,40 % das amostras de fezes de bovinos de carne, em 63,33 % das de bovinos de raça Brava e de 87,31 % das de ovinos, com distribuição muito variável consoante as freguesias em estudo.

Identificaram-se ovos de *Moniezia expansa*, *M. benedeni*, *Fasciola hepatica*, *Ascaridiidae*, *Strongyloides* sp., strongilídeos gastrintestinais (EGI), e nestes *Nematodirus* sp., *Trichuris* sp. e oocistos de *Eimeria* sp. Evidenciaram-se ainda L1 de strongilídeos pulmonares dos géneros *Dictyocaulus* e *Protostrongylus*.

As prevalências das diferentes formas parasitárias foram muito variáveis em função do hospedeiro e da freguesia, no entanto, apresentaram valores superiores para os ovinos, excluindo os referentes a *Moniezia benedeni* e *Trichuris* sp., que apresentaram valores muito semelhantes entre si e aos de *Fasciola hepatica*, que foram inferiores. A família Ascaridiidae apenas foi registada em bovinos de raça Brava e o género *Protostrongylus* apenas nos ovinos.

Predominaram as infecções simples nos bovinos de carne, enquanto que as mistas prevaleceram nos bovinos de raça Brava e nos ovinos.

Considerando os valores de prevalência, de diversidade parasitária e do tipo de infecção identificados, reconheceram-se algumas freguesias onde o risco de contaminação ambiental por parasitas de ruminantes foi maior, nomeadamente as do Couço e da Lamarosa nos bovinos e as de Santana do Mato e da Fajarda nos ovinos. O molusco HI, *Galba truncatula* foi identificado em três (50,00%) dos seis biótopos observados nas freguesias do Biscainho, da Erra e da Branca.

Os resultados permitiram determinar, não só a existência de eliminações de EGI muito baixas e do binómio *Galba truncatula/Fasciola hepatica*, como também reconhecer a existência de esquemas profiláticos que minimizam o impacto das helmintoses na saúde das espécies animais produzidas.

[Parasitism in ruminants from the Coruche council (Portugal)]

Between March and August 2007, a parasitological survey took place in livestock of breeds of beef and fighting cattle and in White Merino sheep, which were raised in extensive breeding systems with a prophylactic program against helminthes and ectoparasites, in order to determine the major cattle helminthic diseases in the Coruche Council (Ribatejo and Oeste, Portugal).

In eight administrative areas of this council and according to the number of breeding systems and animal load, a total of 206 faeces samples were taken from beef cattle breeding systems, 30 from Fighting cattle and 71 from sheep. Coprological exams were performed by qualitative and quantitative methods (spontaneous sedimentation and Willis and McMaster techniques).

In six of those breeding systems, where eggs of *Fasciola hepatica* were identified, habitats were searched for the intermediate host snail.

Eggs, oocysts or 1st stage larvae were observed on 53,40% faeces samples of beef breed, on 63,33% fighting breed samples and 87,31% sheep samples, with a great spatial variability according to the different studied areas.

Eggs of *Moniezia expansa*, *M. benedeni*, *Fasciola hepatica*, *Ascaridiidae*, *Strongyloides* sp., gastrointestinal strongylids (GIS), particularly *Nematodirus* sp., *Trichuris* sp. and oocysts of *Eimeria* sp. were identified. The 1st stage larvae of lung strongylids (genera *Dictyocaulus* and *Protostrongylus*) were also evidenced.

Prevalences of parasites varied according to the host and geographical location, though they were higher in sheep, excluding *Moniezia benedeni* e *Trichuris* sp., which occurred with similar values and *Fasciola hepatica*, with lower ones. Family Ascaridiidae was only observed in fighting breed and *Protostrongylus* just in sheep.

Simple infection was predominant in beef breeds, while co-infections were prevalent in fighting breed and sheep.

Considering prevalence, parasitic diversity and co-infection, high-risk areas of ruminants' parasites contamination were evidenced, such as Couço, Lamarosa (cattle), Santana do Mato and Fajarda (sheep). The intermediate host snail, *Galba truncatula*, was collected from three habitats (50,00%) out of six breeding systems observed.

Finally, these data allow to identify very light GIS egg output and the *Galba truncatula/Fasciola hepatica* bionomics, and to recognize the efficiency of prophylactic programs, which minimize the impact of helminthic diseases in the local livestock health.

Descrição dos primeiros casos de Tremor Epizoótico Clássico em Portugal, com a existência, em simultâneo, da forma Atípica no mesmo efectivo

Orge, L.¹, Oliveira, A.², Machado, C.¹, Lima, C.¹, Ochoa, C.¹, Silva, J.¹, Carvalho, R.¹, Tavares, P.¹, Almeida, P.¹, Ramos, M.¹ e Pinto, M.J.²

¹ INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

² Direcção Geral de Veterinária

Introdução: Desde a implementação, em 2002, do Plano de Vigilância Epidemiológica das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis animais (PVE-EETs), em todos os Estados Membros da União Europeia, foram testados em Portugal até Julho de 2008, 366.384 ovinos e caprinos, pelo teste rápido da BIORAD (73.515 em animais de risco e 292.869 em animais destinados a consumo). A taxa de prevalência de Tremor Epizoótico Atípico encontrada foi de 0.08488% (0.1197% em animais de risco e 0.0761% em animais destinados ao consumo). Os pequenos ruminantes positivos ao Tremor Epizoótico Atípico encontram-se distribuídos por todo o País (excepto na Madeira e nos Açores). Apesar deste Plano de Vigilância intensivo, até ao presente ano não se diagnosticara Tremor Epizoótico Clássico em ovinos portugueses. **Objectivo:** Este trabalho descreve os primeiros casos de Tremor Epizoótico Clássico em ovinos portugueses detectados na mesma Região do País, realçando-se a coexistência da Forma Atípica. **Metodologias:** Todos os casos foram detectados pelo teste rápido TeSeE BIORAD em amostras de tronco cerebral e confirmados pelos exames histopatológico, imunohistoquímico e por Western Blot. As amostras foram submetidas ao Teste Discriminatório para distinguir entre EEB e Tremor Epizoótico. O genótipo Prnp (136/141/154/171) foi determinado por PCR e sequenciação automática. Todos os coabitantes do primeiro rebanho afectado (n=266) e 321 do segundo foram analisados pelo mesmo teste rápido. **Resultados:** No âmbito da Vigilância Activa do PVE-EETs, detectaram-se 9 ovinos portugueses com um fenótipo de Tremor Epizoótico Clássico (2 de consumo e 7 encontrados mortos na exploração). Sete ovinos pertenciam ao mesmo rebanho, no qual também foi confirmado um caso de Tremor Epizoótico Atípico. Os outros dois casos pertenciam a outra exploração. O exame histopatológico, a distribuição da PrPres e o perfil electroforético serão apresentados, assim como o genótipo Prnp. Os resultados preliminares das análises aos coabitantes, também serão incluídos. **Discussão:** Os primeiros focos de Tremor Epizoótico Clássico foram identificados na Região Centro Leste de Portugal. A testagem de todos os pequenos ruminantes saudáveis, abatidos para consumo com mais de 18 meses, tem sido eficaz em todo o país. No entanto, até finais de 2007, a recolha de animais encontrados mortos foi substancialmente realizada na Região Sul. O número de amostras de pequenos ruminantes na Região Norte foi baixa até Setembro de 2007, quando a recolha de cadáveres destes animais se começou a realizar sistematicamente. Este facto, poderá, possivelmente, justificar a identificação destes casos de Tremor Epizoótico Clássico em animais encontrados mortos. No entanto, o conhecimento da epidemiologia da doença, identificando factores de risco relativamente à introdução da infecção e os riscos da possibilidade da doença ocorrer em mais ovinos portugueses, é fundamental. Os nossos resultados também demonstram a possibilidade da coexistência de mais de uma estirpe de EETs no mesmo rebanho.

[First Report of Classical Scrapie in Portugal, including co-existence with atypical scrapie in the same flock]

Background: Since the implementation of a surveillance plan for scrapie in small ruminants in 2002 by all the EU-Member States, a total of 366.384 small ruminants (73.515 risk population and 292.869 healthy slaughter) were tested by the BIORAD rapid test in Portugal, until July 2008. The prevalence rate of atypical scrapie in the tested population was 0,08488% (0,1197% in the risk population and 0,0761% in the healthy slaughter stream). The atypical cases were identified all over the country (except in Madeira and Azores). Despite this extended TSE surveillance, no classical scrapie has been diagnosed in Portuguese sheep until this year. **Objectives:** This work describes the first cases of classical scrapie in Portuguese sheep detected in one region of the country, highlighting the coexistence of atypical scrapie in one flock.

Material and methods: All the classical scrapie cases were detected by the screening test TeSeE BIORAD on brainstem samples and confirmed by histopathology, immunohistochemistry and Western Blot. To distinguish between BSE and scrapie the samples were submitted to the Discriminatory Test for strain typing. The Prnp genotype (136/141/154/171) was determined by PCR and automated cycle sequencing. All the cohorts (n=266) of the first affected flock were culled and screened by the TeSeE BIORAD as well as samples from 321 sheep from the second flock. **Results:** Under the Active Surveillance Plan, a total of nine Portuguese sheep showing classical scrapie phenotype were detected (two slaughtered for human consumption and seven fallen stock). Seven sheep were from the same flock in which one atypical case was also confirmed. The other two cases belonged to a different flock. The histopathology, PrPres distribution and electrophoretic profile will be presented as well as the Prnp genotypes. The preliminary results regarding the cohort's analysis will also be revealed. **Discussion:** The first outbreaks of classical scrapie were identified in the centre east region of Portugal, whereas the atypical scrapie cases have been diagnosed scattered all over the country, mainly in the South. Despite the effectiveness of the sampling of all healthy small ruminants over 18 months slaughtered for human consumption, the collection of fallen stock has been only consistently performed in the southern part of the country. The number of sampled fallen stock small ruminants in the north and centre of Portugal was remarkably low until September 2007, when the collection system for these animals has started systematically. This issue could possibly explain the identification of these classical cases within the fallen stock. Nevertheless, knowledge on the epidemiology of the disease, identifying risk factors for the introduction of scrapie infection and the risk of the disease occurrence in the Portuguese sheep is fundamental. Our results also demonstrate that more than one TSE strain could coexist within in the same flock.

Estudio longitudinal de la eliminación fecal de *Escherichia coli* verotoxigénicos en el ganado ovino: detección de clones persistentes en las explotaciones

Sánchez, S.¹, Martínez, R.¹, García, A.², Blanco, J.³, Blanco, J.E.³, Blanco, M.³, Dahbi, G.³, López, C.³, Mora, A.³, Rey, J.¹, Alonso, J.M.¹

¹ Patología Infecciosa y Epidemiología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10071 Cáceres, España

² Producción Animal, Centro de Investigación Finca La Orden-Valdesequera, Junta de Extremadura, 06187 Badajoz, España

³ Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España

Los *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) son importantes patógenos emergentes para los seres humanos, responsables de graves procesos patológicos como la colitis hemorrágica o el síndrome urémico hemolítico (SUH). Especialmente, el serogrupo O157 está considerado como un importante riesgo para la salud pública en todo el mundo. No obstante, dado que los ECVT no-O157 son más prevalentes en el ganado y como contaminantes en alimentos, es mayor la exposición a este tipo de cepas que al ECVT O157, razón por la cual no debe obviarse a los ECVT no-O157 como causantes de infecciones en seres humanos. Aunque el ganado bovino sano está considerado como el principal reservorio animal de ECVT, en algunos países el ganado ovino constituye una importante fuente de infecciones por ECVT en seres humanos. Sin embargo, se conoce relativamente poco acerca de la colonización natural de los ovinos por ECVT durante largos periodos de tiempo, así como su ecología en las propias explotaciones. Por ello, se llevó a cabo un estudio de seguimiento longitudinal con objeto de aportar información acerca de la persistencia y mantenimiento de la colonización por ECVT tanto en las explotaciones como en los ovinos individualmente, en el contexto de un típico rebaño ovino del suroeste de la Península Ibérica.

El estudio tuvo lugar entre los meses de noviembre de 2003 y octubre de 2004 en 4 explotaciones ovinas no relacionadas epidemiológicamente, en cada una de las cuales se seleccionaron 12 ovejas en torno a 1 año de edad. En cada muestreo mensual se tomaba 1 muestra de heces por animal, muestras que se analizaban para la detección de ECVT. En total se obtuvieron 521 aislados de ECVT, cuyo antígeno O fue determinado para establecer el serogrupo al que pertenecían. Entre ellos, se subtiparon mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) 64 aislados de ECVT O91 procedentes de 26 animales sanos pertenecientes a las 4 explotaciones, ya que el serogrupo O91 ha sido frecuentemente descrito entre los ECVT ovinos y asociado además con los ECVT humanos causantes del SUH. El presente estudio demostró que determinados clones de ECVT no-O157 pueden aislarse en una misma explotación y en un mismo animal durante al menos 11 meses, con periodos de eliminación en los animales de hasta 3 meses consecutivos. Considerando el bajo grado de reemplazamiento de los animales a lo largo del año que caracteriza a este tipo de sistemas productivos ovinos, es probable que esta colonización persistente de los animales individualmente explique la persistencia de perfiles de PFGE observada en las explotaciones durante largos periodos de tiempo.

[Longitudinal study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* fecal shedding in sheep: persistence of specific clones on sheep flocks]

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) have recently emerged as important food-borne pathogens. Human diseases ranging from mild diarrhoea to hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS) can be caused by STEC. Especially serogroup O157 represents a major public health concern worldwide. However, as non-O157 STEC strains are more prevalent than STEC O157 in meat-producing animals and as contaminants in foods, humans are more likely to become exposed to such strains, therefore non-O157 STEC should not be overlooked in human disease investigations. Although healthy asymptomatic cattle are the best-recognized animal reservoir for STEC, sheep are an important source of these organisms for humans in some countries. Nevertheless, little is known about the natural colonization of sheep with STEC over long time periods and their ecology on sheep flocks. A longitudinal study was conducted to provide information on the persistence and maintenance of colonization with STEC at the flock level as well as the individual-animal level in the context of a typical sheep flock in south-western Iberian Peninsula.

The study was conducted from November 2003 to October 2004 on four epidemiologically unrelated sheep flocks, where 12 ewes around one year of age were randomly selected on each flock. On each monthly sampling occasion, one sample of rectal feces per animal was collected. STEC isolates (n = 521) were cultured from ovine fecal samples, and the determination of O antigen in isolates was carried out. Between them, a total of 64 STEC O91 isolates from 26 healthy animals on four flocks were characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), since O91 serogroup has been frequently reported within ovine STEC strains and associated with human strains that caused HUS. The present study demonstrated that some clones of non-O157 STEC can be isolated from the same sheep flock as well as the same animal over a period of at least 11 months, and for as long as 3 months on consecutive sampling occasions in the same animal. Given the low rate of animal turnover which is typical of these sheep production systems, persistent individual-animal colonization by specific clones is the most probable explanation for persistence of PFGE types at the flock level over long time periods.

Seroprevalencia de la Enfermedad de la Frontera (Border Disease) en ganado ovino

Maldonado, A.¹, Tarradas, C.¹, Astorga, R.¹, Huerta, B.¹, Gómez-Pacheco, J.M.², Segado, F.¹, Gómez, J.M.³, Luque, I.¹
 1 Dpto de Sanidad Animal. Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071; 2 Laboratorio de Sanidad Animal de Córdoba. Junta de Andalucía; 3 Veterinario Clínico

La Enfermedad de la Frontera es una enfermedad congénita de los corderos, llamada así por haberse descrito por primera vez en la frontera entre Gales e Inglaterra. Está producida por la infección del feto ovino con un pestivirus, familia Flaviviridae, género en el que se incluye el virus de la Diarrea Vérica Bovina y el de la Peste Porcina Clásica, con los que guarda una fuerte relación estructural y antigénica. La infección en los ovinos adultos suele dar lugar a un cuadro clínico de poca importancia, y los animales eliminan el virus de forma transitoria. Pero si la infección tiene lugar en hembras gestantes la expresión clínica de la enfermedad dependerá del momento de la gestación en que tenga lugar esta infección, manifestándose, si ésta tiene lugar al comienzo, por placentitis y muerte fetal con reabsorción, aborto o momificación. Si la infección se produce entre los 16 y 80 días de gestación, nacen corderos inmunotolerantes y persistentemente infectados, eliminando el virus de forma continua, convirtiéndose en la principal fuente de infección.

En los corderos recién nacidos la enfermedad puede manifestarse por contracciones musculares de los miembros anteriores y espalda, temblores musculares, ceguera, anomalías de la marcha, malformaciones esqueléticas, retraso en el crecimiento y un aumento en la cantidad de pelos largos en el vellón, especialmente sobre el cuello y la espalda.

Dada la casuística de trastornos de la reproducción observada en el Servicio de Diagnóstico del Departamento de Sanidad Animal en ovino y caprino, nos propusimos realizar un estudio serológico de Border Disease (BD) con el fin de conocer la prevalencia de la infección.

Material y métodos: Se ha recogido una muestra para realizar una encuesta sobre un total de 2076 sueros pertenecientes a 36 colectivos, mediante un cálculo de muestreo estadístico (nivel de confianza del 95%). Las prevalencias esperadas, tanto de colectivos como de individuos, se determinaron mediante consulta bibliográfica.

El método de muestreo utilizado fue el de etapas múltiples, determinando para ello en primer lugar el número de colectivos a encuestar; esta primera muestra fue estratificada atendiendo al tamaño de la explotación en tres grandes grupos: explotaciones de más de 1000 individuos, entre 300 y 1000 y con menos de 300 animales. Posteriormente, se determinó el número de animales a analizar dentro de cada colectivo, seleccionando esta muestra mediante un método aleatorio simple. Para la realización de esta encuesta hemos utilizado un Ensayo Inmunoenzimático de Competición para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Diarrea Vérica Bovina (INGEZIM BVD COMPAC 1.2 BVD.K.3, INGENASA).

Resultados:

Colectivos/Individuos	nº Colectivos./indiv.	Colectivos + n°/%	Individuos + n°/%	Rango de infección
Pequeñas ≤ 300	11/557	9/29'03	276/49'55	6'82 – 96'61
Medianas ≤ 1000	15/921	13/41'93	276/29'96	1'69 – 86'44
Grandes > 1000	10/537	9/29'03	282/52'51	4'00 – 88'52
Total	36/2076	31/86'11	834/40'17	1'69 – 96'61

La proporción de infectados que más se repite dentro de las explotaciones se encuentra entre un rango de valores que va desde el 60 hasta el 70%. La prevalencia de explotaciones infectadas es del 86'11% (IC: 74'85 – 97'37) y la de individuos es del 40'17% (IC: 38'08 – 43'79).

[Seroprevalence of Border Disease in ovine flocks]

Border Disease is a congenital disorders of lambs, what was first reported in the region of the English/Welsh border. The disease is caused by a pestivirus (Flaviridae family), closely related, structural and antigenically, to the viruses of bovine viral diarrhoea/mucosal disease and classical swine disease. When healthy non-pregnant sheep are infected with BDV for the first time, it usually results in mild or subclinical disease which is unlikely to detect. The most serious consequences occur when BDV infects susceptible pregnant ewes. The ewes show no clinical signs but virus spreads quickly to the placenta and crosses to the foetus within one week of infection. The infection in the initial period of gestation causes placentitis and foetal reabsortion. However, when the infection occurs between 16 and 80 days of gestation, surviving lambs are persistently viremic, and the virus is present in their excretions and secretions, and constituting the chief responsible for dissemination of the virus. The disease in newborn lambs is characterized by low birth weight and viability, poor conformation, tremor, blindness, and an excessively hairy birth coat in normally smooth-coated breeds.

Due to the frequency of reproductive outbreaks occurred in ovine and goat farms, received in the Diagnosis Service of Health Animal Department of Cordoba University, we proposed to carry out an serological analysis to determine the seroprevalence of Border Disease in ovine livestock.

Material and methods: A size of sample of 2076 ovine sera belonged to 36 farms were obtained to realize an epidemiological analysis for a confidence level of 95 per cent. The expected prevalence of the disease among and within the farms were obtained of previous published works. We used a multiple steps sampling, stratify the sample in three groups: Big flock: with more than 1000 animals, Medium-sized: among 300-1000 animals and Small: less than 300 animals. Later, the number of animals within the herd was calculated using a simple random method. To determine the presence of antibodies in the sera we used the INGEZIM BVD COMPAC 1.2 BVD.K.3 Kit (INGENASA, S.A.).

Results

Flock/Animals	Nº flock/Animals	Positive Flocks n/%	Positive Animals n/%	Range of Infection
Small ≤ 300	11/557	9/29.03	276/49.55	6.82 – 96.61
Medium ≤ 1000	15/921	13/41.93	276/29.96	1.69 – 86.44
Big > 1000	10/537	9/29.03	282/52.51	4.00 – 88.52
Total	36/2076	31/86.11	834/40.17	1.69 – 96.61

The proportion of infected animals within a flock more frequently observed varies among 60 and 70 per cent. The prevalence of infected flocks is 86.11% (CI: 74.85 – 97.37) and the proportion of infected animals is 40.17% (CI: 38.08 – 43).

Estado inmune humoral frente al virus del moquillo canino, parvovirus canino y leptospiras en un criadero canino de Mastin del Pirineo tras la vacunación

Simón, M.C.¹, Ortega, C.¹, Saldivia, C.², Alonso, J.¹

¹ Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza

² Departamento de Salud Animal, Facultad de Veterinaria de Barquisimeto (Venezuela)

Se evaluó el título de anticuerpos (Ac) frente al virus del Moquillo (CDV), al Parvovirus canino tipo 2 (CPV) y leptospiras (LPT) en un criadero de Mastín del Pirineo, tras la vacunación.

Es un estudio realizado con 22 perros (11 cachorros y 11 adultos). Se extrajo suero el día de la vacunación y 2 semanas después. La vacunación empezaba a las 6 semanas con CDV y CPV atenuados (Puppy DP; Intervet SA). A las 8, 12, 24 semanas y anualmente se usaba vacuna viva de CDV, CPV, Adenovirus canino tipo 2, virus Parainfluenza canino y muerta de *L. interrogans* sv. canicola e icterohaemorrhagiae (Vanguard 7; Pfizer). Los Ac frente a CDV, CPV y LPT se detectaron por Seroneutralización, Inhibición de la Hemoaglutinación y ELISA, respectivamente.

La media global de Ac frente a CDV, CPV y LPT fue de 1:49, 1:578 y 1:64, respectivamente. No había asociación ($p > 0,05$) entre edad y género con la media de Ac frente a CDV y CPV, sí se encontró ($p \leq 0,05$) frente a LPT, donde los adultos tenían media de Ac superior (1:549) a los cachorros (1:39); y las hembras (1:294) superior a los machos (1:97). No había asociación entre el número de recuerdos anuales y la media de Ac frente a CDV y CPV, sí frente a LPT ($p = 0,0024$), que tendía a aumentar con el número de revacunaciones.

Se comparó el título de Ac frente a CDV, CPV y LPT de una madre (1:128, 1:2521 y 1:39 respectivamente) respecto a la media de sus cachorros de 6 semanas (1:5, 1:14 y 1:8, respectivamente). Conociendo el porcentaje de Ac frente a CDV y CPV que transmite la madre y su vida media, se dedujo que la media de Ac frente a CDV de los cachorros era la esperada, pero frente a CPV era 9,5 veces inferior.

Tras la vacunación los cachorros de 6 semanas mostraron seroconversión en Ac frente a CDV (de 1:5 a 1:215) y CPV (1:14 to 1:4240). Tras la segunda vacunación se observó seroconversión (1:2048) frente a CDV, pero descendió a 1:2521, frente a CPV. La media de Ac frente a LPT aumentó entre las 6 y 8 semanas (de 1:8 a 1:40) sin haber sido vacunados. Tras la vacunación la seroconversión fue mayor (1:301). La cuarta vacunación de 3 cachorros produjo un descenso del título de Ac frente a los 3 agentes. La vacunación anual de los adultos no aumentó los títulos de Ac frente a CDV y CPV, pero sí frente a LPT (1:276 a 1:1044).

[Humoral immune status against canine distemper virus, canine parvovirus and leptospiras in a breeding kennel of Pyrinean Mastif after vaccination]

A breeding kennel of Pyrinean Mastif was studied to evaluate the humoral immune status against Distemper Virus (CDV), Canine parvovirus (CPV) and *Leptospira* spp (LPT) after vaccination.

This study was carried out on 22 dogs (11 puppies and 11 adult dogs). Sera samples were taken the day of vaccination and two weeks after. Vaccination started in 6 weeks old puppies with CDV, CPV live valences (Puppy DP; Intervet SA), the polyvalent vaccine (CDV, CPV, canine adenovirus type 2, canine parainfluenza virus live attenuated valences and *L. interrogans* sv. canicola and icterohaemorrhagiae (LPT) dead valences; Vanguard 7; Pfizer) was used at 8, 12 and 24 weeks old and on annual boosters.

Antibodies (Ab) against CDV, CPV2 and *Leptospira* were detected by Seroneutralization test, Haemoagglutination Inhibition Test and ELISA respectively.

Overall mean of Ab against CDV, CPV and LPT were 1:49, 1:578 and 1:64, respectively. There was not association ($p > 0,05$) between age and genre with the mean of Ab against CDV and CPV, but there was ($p \leq 0,05$) against LPT, where adult dogs showed a higher mean (1:549) than puppies (1:39); and females showed higher mean (1:294), than males (1:97). There were not association ($p > 0,05$) between annual boosters number and mean of Ab against CDV, CPV but it was against LPT ($p = 0,0024$) where it tended to increase with the boosters number.

Comparing Ab titres against CDV, CPV and LPT of a bitch (1:128, 1:2521 and 1:39 respectively) with that of its 8 puppies 6 weeks old (1:5, 1:14 and 1:8, respectively) and knowing the percentage of maternal derived Ab against CDV and CPV received by puppies and its halflife, it was deduced that mean of Ab against CDV was that expected, while mean of Ab titres against CPV was 9,75 times lower than expected.

After vaccination 6 weeks old puppies showed seroconversion increasing since 1:5 to 1:215 the titre against CDV and since 1:14 to 1:4240 against CPV. After the second vaccination it increased 9,5 times the titre against CDV, while mean of Ab against CPV decreased to 1:2521. Mean of Ab titres against LPT increased between 6 and 8 weeks old without being vaccinated (1:8 to 1:40) and after vaccination there was seroconversión (1:301). Three puppies 5,5 to 6 weeks old received the fourth vaccination but means of Ab against CDV, CPV and LPT decreased.

Annual booster did not induce the increasing of titres against CDV and CPV, but it produced a significant increasing of titres against LPT (1:276 to 1:1044).

Factores de riesgo de la infección por agentes del género *Campylobacter* spp. en perros procedentes de clínicas en Córdoba (España)

Carbonero, A.¹, Arenas, A.¹, Campos, E.², Huerta, B.¹, Borge, C.¹, García, I.¹, Torralbo, A.¹, Perea, A.¹

¹ Animal Health Department. Cordoba University

² Veterinarian of Santa Rosa Clinic (Cordoba)

En las últimas décadas, distintas especies del género *Campylobacter* han incrementado su importancia desde el punto de vista de la salud pública hasta haberse situado en algunos países desarrollados como la primera causa de toxiinfecciones alimentarias (datos del CDC de Atlanta). Las especies más frecuentemente involucradas en estas toxiinfecciones son *C. jejuni* y *C. coli*, transmitidas a partir de canales de pollo. También se ha demostrado la transmisión por contacto directo al hombre de *C. upsaliensis*, que se encuentra casi exclusivamente en el intestino de la especie canina.

En este estudio se tomaron muestras rectales procedentes de perros que acudieron a distintas clínicas de Córdoba entre mayo de 2007 y marzo de 2008. Simultáneamente a la recogida de las muestras se realizó una encuesta epidemiológica que incluyó las variables edad, sexo, estado del animal (sano o enfermo), proceso entérico (sí o no) y presencia o no de niños en la familia propietaria del perro.

Las muestras se sembraron en medio para *Campylobacter* sin sangre (Campylobacter Free Blood Agar, OXOID®) con suplemento CAT, dentro de las 24-48 horas siguientes a la recogida, en condiciones de microaerofilia y a 42 °C. La identificación de las cepas aisladas fue realizada mediante caracterización fenotípica (pruebas de tinción de Gram, motilidad en campo oscuro, catalasa y oxidasa). Las cepas dudosas se confirmaron mediante una prueba comercial de aglutinación el látex (Campylobacter Test Kit, OXOID®). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 11.0 para Windows®, determinándose la Chi cuadrado y, en aquellas variables dicotómicas, la Odds Ratio.

Se aislaron especies del género *Campylobacter* en 87 de las 293 muestras analizadas (29,7%), comprobándose que de las variables estudiadas resultaron encontrarse asociadas con un nivel de significación del 95% la edad del perro ($p=0,014$) y la presentación de procesos entéricos ($p=0,001$).

[Risk factors for infection by *Campylobacter* spp. in dogs from clinics from Cordoba (Spain)]

In last years, several *Campylobacter* species have increased their importance from a public health point of view, to be located in some developed countries as the leading cause of human food-borne infections. The main species are *C. jejuni* and *C. coli*, transmitted from chicken carcass. It has also demonstrated the transmission to humans through direct contact of *C. upsaliensis*, found almost exclusively in the intestine of the canine species.

In this study, rectal swabs were taken from dogs in clinics from Cordoba between May 2007 and March 2008. An epidemiological survey was performed simultaneously with the collection of samples. The questionnaire for this survey included the variables: age, sex, status of the animal (healthy or sick), enteric disease (yes or no) and existence of children in the family that owns the dog.

The samples were cultured in a media for *Campylobacter* (Campylobacter Free Blood Agar, Oxoid®) with CAT supplement in the 24-48 hours after the collection. The temperature of incubation was of 42° C, in microaerophilic conditions. The identification of strains isolated was performed by phenotypic characterization (testing of Gram stain, dark field motility, oxidase and catalase). The doubtful strains were confirmed by a commercial latex agglutination (Campylobacter Test Kit, Oxoid®).

Statistical analysis was performed using the SPSS 11.0 for Windows®, determining the Chi-square, and the Odds Ratio (this one only for dicotomic variables).

Campylobacter species were isolated in 87 of the 293 samples analyzed (29.7%), Significant associations were found with a significance level of 95% between the infection for *Campylobacter* and the age of the dog ($p = 0014$) and the presentation of enteric disease ($p = 0001$).

Estudio Epidemiológico de la Ehrlichiosis y Enfermedad de Lyme en perros de la provincia de Cádiz (España)

Tarradas, C.¹, González, M.¹, Maldonado, A.¹, Carbonero, A.¹, Astorga, R.¹, Vilaplana, F.², Borge, C.¹, Luque, I.¹

¹ Dpto. Sanidad Animal. Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba.

² Colegio Oficial de Veterinarios de Cádiz. Avda. Ana de Viya, 5. 11009-Cádiz

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico para determinar la seroprevalencia de Ehrlichiosis y Enfermedad de Lyme en la población canina de la provincia de Cádiz. Asimismo, se han aplicado análisis estadísticos para determinar los principales factores de riesgo asociados a estas enfermedades, con los datos suministrados por Veterinarios del Colegio Oficial de Veterinarios de Cádiz. Se ha trabajado con un tamaño de muestra que permite detectar la prevalencia para cada enfermedad con un nivel de confianza del 95 por ciento y una precisión del 5 por ciento. Se han analizado 296 muestras de suero canino procedentes de cuatro distritos sanitarios, 125 del Distrito Sanitario de Bahía de Cádiz, 62 de Jerez-Campiña, 65 de animales procedentes de Campo de Gibraltar y 44 de la Sierra de Cádiz,

Para la detección de anticuerpos frente a Ehrlichia canis y Borrelia burgdorferi se ha aplicado una técnica comercial inmunoenzimática SNAP3DX. Se han definido un total de 28 variables, cuatro relacionadas con el animal, ocho relacionadas con el medio externo, once con el manejo y cuatro con el estado sanitario de los animales en el momento de la toma de muestras, aplicando un análisis univariante para definir la población de estudio, y bivariante para determinar los factores de riesgo asociados a la seropositividad (variable dependiente).

De las 296 muestras de suero analizadas, 28 resultaron positivas a Ehrlichiosis, y tres a la enfermedad de Lyme, lo que supone una seroprevalencia global del 9.50% (IC: 6'16 - 12'84) y 1% (IC: 0'00 - 2'13), respectivamente, resultados que demuestran la presencia la infección por E. canis y B. burgdorferi en perros de la provincia de Cádiz. Analizando los resultados en función del distrito sanitario, se observa que el porcentaje de animales positivos más elevado frente a Ehrlichiosis se encuentra en Campo de Gibraltar (30.75%; IC: 19'54 - 41'96), con diferencias acusadas frente al resto de distritos sanitarios estudiados. Los resultados del estudio epidemiológico muestran que las variables edad (>4 años), distrito sanitario y convivencia con otros perros muestran relación estadísticamente significativa con la variable seropositividad a Ehrlichiosis. No se ha encontrado relación con otras variables analizadas del animal, medio o estado sanitario. Si bien no se observan diferencias significativas entre la variable presencia de signos clínicos y la seropositividad a ehrlichiosis, atendiendo a los resultados sugerimos que ante la presencia de fiebre, inapetencia, adelgazamiento y malestar, se debe incluir la Ehrlichiosis en el diagnóstico diferencial en la clínica veterinaria

[Epidemiological survey of Ehrlichiosis and Lyme Disease in dogs in Cadiz province (Spain)]

An epidemiological survey was carried out to determine the prevalence of Ehrlichiosis and Lyme disease among canine population of Cadiz province. Therefore, a statistical analysis has been performed to determine the main risk factors associated to these diseases, with the data offered by practitioners belonging to the Official College of Veterinary from Cadiz. A sample size to detect the prevalence of each disease with a confidence level of 95 per cent and accuracy of 5% was obtained. A total of 296 sera obtained from dogs belonged to four sanitary districts, 125 from Bahia de Cadiz, 62 from Jerez-Campiña, 65 from animals living in Campo de Gibraltar and 44 in the Sierra of Cádiz.

A commercial immunoenzymatic assay SNAP3DX (IDEXX lab.) for antibodies detection to Ehrlichia canis and Borrelia burgdorferi was used. A total of 28 variables were analyzed in this study, four related to the animal, eight with the external media, eleven with the management and four related to the sanitary state of the animals at sampling. A descriptive univariate analysis was performed to define the studied population, and bivariate analysis were applied to determine the possible risk factors by comparing the Seropositivity to the disease (dependent variable) with each independent variables analyzed, using SPSS 12.0 software Inc. for Windows. Differences were considered significant when probabilities were lower than 0.05.

From 296 serum samples analysed, 28 were positive to Ehrlichiosis, 3 to Lyme disease, the seroprevalence obtained were 9.50% (CI: 6.16 - 12.84), 1% (CI: 0.00 - 2.13), respectively. These results demonstrate the circulation of E. canis and B. burgdorferi infections among the canine population of Cadiz province. The higher values of Ehrlichiosis were obtained in Campo de Gibraltar (30.75%; CI: 19.54 - 41.96), with important differences with other sanitary districts studied. The variables Age (>4 years old), Sanitary District and Living with other dogs show statistical relationship with the variable Seropositivity to Ehrlichiosis. Other variables studied do not show significant relationship with the dependent variable (Seropositivity to Ehrlichiosis). Although there are not significant differences among Clinical Signs and Seropositivity to Ehrlichiosis, we suggest to include in the differential diagnosis of Ehrlichiosis when an animal showing fever, anorexia, slimming and discomfort.

Estudio epidemiológico de la Hepatitis E en perros de la provincia de Cádiz (España)

Luque, I.¹, González, M.¹, Peralta, B.², Mateu, E.², Maldonado, A.¹, Carbonero, A.¹, Vilaplana, F.³, Tarradas, C.¹

1 Dpto. Sanidad Animal. Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba.

2 Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Edifici CReSA. Campus UAB. 08193 Bellaterra.

3 Colegio Oficial de Veterinarios de Cádiz. Avda. Ana de Viya, 5. 11009-Cádiz

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico para determinar la seroprevalencia de Hepatitis E en la población canina de la provincia de Cádiz. Se ha trabajado con un tamaño de muestra que permite detectar unos valores de seroprevalencia del 24 por ciento, de acuerdo con estudios previos (Peralta y cols., 2006), con un nivel de confianza del 95 por ciento y una precisión del 5 por ciento. Se han analizado 296 muestras de suero canino procedentes de cuatro distritos sanitarios, 125 del Distrito Sanitario de Bahía de Cádiz, 62 de Jerez-Campiña, 65 de animales procedentes de Campo de Gibraltar y 44 de la Sierra de Cádiz. Para la obtención de las muestras hemos contado con la colaboración de veterinarios responsables de Clínicas Veterinarias y coordinados por el Iltre. Colegio Oficial de Veterinarios de Cádiz.

Para la detección de anticuerpos frente al virus de la Hepatitis E se ha aplicado un ELISA desarrollado en los laboratorios del CReSA (Barcelona). Por otro lado, sobre todas las muestras positivas se ha utilizado una técnica de PCR para la detección del genoma vírico. El estudio epidemiológico se ha llevado a cabo mediante el programa informático SPSS® 10.0 para Windows, analizando un total de 28 variables, cuatro relacionadas con el animal, ocho relacionadas con el medio externo, once con el manejo y cuatro con el estado sanitario de los animales en el momento de la toma de muestras.

De las 296 muestras de suero analizadas, 46 resultaron positivas, lo que supone una seroprevalencia del 15.50 por ciento (IC: 11'38 – 19'62). Analizando los resultados en función del distrito sanitario, hemos obtenido mayores valores de seroprevalencia en la zona de Bahía de Cádiz, con un 21.60 por ciento (IC: 14'39 – 28'81) de individuos infectados. Estos datos que demuestran la circulación de este virus entre la población canina de Cádiz. No obstante, las técnicas de PCR aplicadas para determinar la presencia del genoma vírico en los sueros positivos, ha resultado negativo en todos los casos. El estudio de factores de riesgo asociados a la infección por el virus de la Hepatitis E muestra que sólo la variable sexo está relacionada con la seroprevalencia de HEV, siendo más probable la infección en machos que en hembras (O.R. =2.068, 1.081-3.956).

[Epidemiological survey of Hepatitis E in dogs in Cadiz province (Spain)]

An epidemiological survey to determine the prevalence of Hepatitis E among the canine population of Cadiz province was carried out. A sample size to detect an expected prevalence of 24 per cent, according to previous results (Peralta et al., 2006) with a confidence level of 95% and accuracy of 5%, was obtained. A total of 296 sera obtained from dogs belonged to four sanitary districts, 125 from Bahia de Cádiz, 62 from Jerez-Campiña, 65 from animals living in Campo de Gibraltar and 44 in the Sierra of Cádiz. Serum samples and epidemiological data were obtained by practicioners, which belonged to the Oficial College of Veterinary from Cadiz.

An ELISA manufactured by CReSA laboratories for the detection of antibodies to Hepatitis E virus was used in this study. All positive sera were furthermore analyzed by a PCR probe to detect the viral genome. Therefore, an epidemiological analysis has been performed to determine the main risk factors associated to this disease, using the SPSS 12.0 software Inc. for Windows. Differences were considered significant when probabilities were lower than 0.05. A total of 28 variables were analyzed in this study, four related to the animal, eight with the external media, eleven with the management and four related to the sanitary state of the animals at sampling.

The seroprevalence obtained to Hepatitis E among canine population of Cadiz province was of 15.50% (CI: 11.38 - 19.62). The higher values were detected in Bahia de Cadiz, with a 21.60 per cent of infected dogs (CI: 14.39 - 28.81). These data prove the circulation of this virus among the canine population of Cadiz province. However, all serum samples were negative to PCR probes to detect a specific gene fragment of this virus. The study of the risk factors associated to the Hepatitis E seropositivity show that variable Sex is significantly associated to the infection, resulting more probably the infection in male than in female (O.R. =2.068, 1.081-3.956).

Resistencia a antibióticos en microorganismos ubicuos de perros de compañía; ¿existe riesgo de transmisión de la resistencia al hombre?

Ortega, C., Simón, M.C., Alonso, J.L., Gimeno, O.

Universidad de Zaragoza

Uno de los problemas a los que se enfrenta la salud pública es la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, ya que el uso sistemático de estos produce una presión selectiva que favorece la aparición de resistencias. Otro factor agravante es que los animales son el reservorio de microorganismos (ubicuos y patógenos) que pueden ser transferidos desde estos al hombre, lo que los convierte en reservorios potenciales de resistencia que podría transferirse al hombre. Entre los microorganismos que pueden ser compartidos entre los animales y las personas hay que destacar, en los animales de compañía, a *Pseudomonas aeruginosa* y los Enterococos y Estreptococos. Estos microorganismos están causando grandes problemas en medicina, entre otras razones por el desarrollo de resistencia a los antibióticos que se utilizan para tratarlos, generando enfermedades nosocomiales hospitalarias complicadas de resolver.

El objetivo de este trabajo ha sido conocer el estado de resistencia y sensibilidad a los antibióticos de uso habitual en veterinaria y a los indicadores de resistencia para la especie humana en dos grupos de microorganismos ubicuos aislados en perros y que son considerados de “alerta” en el estudio de la resistencia a antibióticos en el hombre: *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus spp.*

El estudio se ha realizado durante el año 2007 a partir de cepas de aquellas bacterias aisladas de perros llegados al Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Las muestras se tomaron mediante hisopos a partir de aparato digestivo, respiratorio, reproductor, mama y oído, siendo cultivados en Agar Sangre, identificados y finalmente se realizó el estudio de resistencia mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer y la determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias con el método CIMEvaluator (OXOID) (Vancomicina para Enterococos y Gentamicina y Ciprofloxacina para *Pseudomonas aeruginosa*).

Los microorganismos considerados ubicuos y que han sido aislados con mayor frecuencia corresponden al género *Pseudomonas spp* y en el grupo de los Enterococos han destacado: *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus canis*. Los resultados han evidenciado un importante nivel de resistencia a antibióticos de uso veterinario de manera que podría llegar a considerarse que en la mayoría de los casos son cepas “multirresistentes”. Los resultados para los antibióticos indicadores de resistencia en el hombre sugieren que las cepas aisladas de animales de compañía mantienen una aceptable sensibilidad a dichos antibióticos, siendo particularmente alta la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* para la Ciprofloxacina y alta la de la Gentamicina. En el caso de los Enterococos la mayoría de las cepas aisladas han presentado una sensibilidad intermedia a la Vancomicina.

[Antibiotic resistance in microorganisms isolated in companion dogs; does it exist risk of resistance transmission to the men?]

One of the most important challenges of the Public Health is the increase of the bacteria resistant to antibiotics in most cases as a consequence of the misuse of them. On the other hand, animals are the reservoir of ubiquitous microorganisms that can be transmitted to men which means that also they can be reservoirs of the resistance to antibiotics and to play any role on the transmission of that resistance. Some of these microorganisms that can be shared by men and companion animals are *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp* and *Streptococcus spp*. These microorganisms can produce important diseases in men because usually they develop resistance to the used antibiotics in Human Medicine.

This study was designed to know the level of resistance to the antibiotics used in Veterinary Medicine and to reference antibiotics for Human Medicine in two of that microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus spp*. Bacteria were isolated during the year 2007 from dogs that arrived to the Veterinary Faculty affected by digestive, respiratory, reproductive, mamma or ear pathology. Samples were isolated and identified in the laboratory. Resistance to antibiotics was evaluated by Kirby-Bauer Disk Diffusion test and CIMEvaluator (OXOID). The last was used to Vancomycin in *Enterococcus spp* and Gentamicin and Ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* as reference antibiotics for Human Medicine.

Microorganisms of the *Pseudomonas spp* group were the most prevalent in the studied population, and *Pseudomonas aeruginosa* the most important in it, while in the *Enterococcus spp* group the higher prevalence was observed in the cases of *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus canis*. All of the isolated bacteria presented a high level of resistance to the antibiotics used in Veterinary Medicine that we have studied. In most cases the isolated strains were resistant to a big number of these antibiotics which means that these strains must be considered as multiresistant.

The study of the resistance to the antibiotics of reference in Human Medicine have demonstrated that, by the moment, these bacteria presented low levels of resistance. All of the presented high sensibility to Ciprofloxacin and Gentamicin in the case of *Pseudomonas aeruginosa* and to Vancomycin in the case of the *Enterococcus spp*.

Aproximación al riesgo de transmisión de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos en poblaciones cunícolas

Ortega, C., Simón, M.C., Alonso, J.L., Gimeno, O.

Universidad de Zaragoza

La resistencia a antibióticos es un desafío tanto para la Salud Pública como para la Sanidad Animal. Los aislamientos de cepas de *Escherichia coli* resistente a antibióticos han aumentado no solo en el hombre, sino de forma especial en los animales, pudiendo estos jugar un papel importante como fuente de resistencia a antibióticos tanto a través de la cadena alimentaria como por contacto directo. El objetivo de este estudio ha sido conocer la prevalencia de cepas de *E. coli* aisladas en conejo y resistentes a los principales antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria para poder valorar el riesgo de transmisión para el hombre.

Las cepas de *E. coli* se obtuvieron de muestras de explotaciones cunícolas con procesos digestivos remitidas al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza con el fin de obtener un diagnóstico a lo largo del año 2006. Los estudios de resistencia se realizaron mediante el método de Difusión en Disco de Kirby Bauer y utilizando los estándares del CLSI y la OIE para su interpretación. Las quinolonas se incluyeron en el panel de estudio por su importancia en medicina humana, mientras que la apramicina y la neomicina se incluyeron por ser los antibióticos más utilizados en las granjas de cunicultura de España ante procesos digestivos. Además, otros antibióticos como penicilinas o tetraciclinas se incluyeron en el estudio para evaluar la presencia de cepas multirresistentes.

La resistencia a Quinolonas de las cepas de *E. coli* aisladas ha presentado mayor prevalencia para el Acido Nalidíxico (66.7%), resistencia que disminuye para el resto de quinolonas paralelamente a la antigüedad de uso de las mismas (flumequine 49.4%, Enrofloxacin 45.3% y Ciprofloxacina 33.7%). El estudio también ha puesto de manifiesto que en el caso de la Apramicina el 24.1% de las cepas presentaban resistencia y que el 40.3% de las mismas tenían resistencia intermedia. En el caso de la Neomicina, las cepas resistentes fueron el 26.4% y el 24.2% fueron cepas de resistencia intermedia.

Un análisis de riesgos cualitativo sugiere que para las quinolonas, antibióticos de referencia en salud pública, el riesgo de transmisión de resistencia es bajo o inapreciable debido al bajo uso de estos antibióticos en sanidad animal. La situación es diferente para la Apramicina y la Neomicina, antibióticos que son utilizados sistemáticamente en sanidad animal para resolver problemas digestivos asociados a infecciones por *E. coli*. En este caso el riesgo de transmisión de resistencia a estos antibióticos debe ser considerado como moderado para la Neomicina y elevado para la Apramicina. Por último hay que indicar que la proporción de cepas multirresistentes ha sido muy elevada, siendo frecuente la resistencia cruzada entre diversos antibióticos, especialmente entre las quinolonas.

[Risk of transmission of resistant to antibiotics *E. coli* strains in rabbit populations]

The increase of the prevalence of microorganisms resistant to antibiotics has been defined as a worldwide challenge for Veterinary Public Health. *E. coli* is included in some programs for surveillance their resistance to antibiotics, specially to quinolones in Human Medicine. The manuscript presents the results of a study of resistance to antibiotics on *E. coli* strains isolated in rabbit farms and their potential role in transmission of the resistance for Public Health and Animal Health in the case of Quinolones as reference antibiotics in Human Medicine and Apramycin and Neomycin as the most used antibiotics in the treatment of digestive rabbit outbreaks.

E. coli strains were isolated in the Veterinary Faculty Laboratories in animals coming from rabbit farms affected by digestive outbreaks during the year 2006. Resistance to antibiotics was evaluated by Kirby-Bauer Disc Diffusion test and the standards of CLSI and OIE.

We have detected a high prevalence of resistant and multiresistant *E. coli* strains. Resistant to Quinolones in the isolated strains were: Nalidixic acid 66.7 %, Flumequine 49.9%, Enrofloxacin 45.3% and Ciprofloxacina 33.7%. Results suggest that oldest quinolones presented higher prevalence of resistant strains than modern quinolones. In the antibiotics used in Veterinary Medicine, we have detected a 24.2% of resistant strains to Apramycin and 40.3% of the strains presented intermediate resistance to this antibiotic, while resistance to Neomycin was 26.4% and 24.2% of the strains presented intermediate resistance to this antibiotic.

We have conclude that, at present, the risk for Quinolones resistance transmission to men is low because the limited use of quinolones in rabbit populations, while the risk of resistance transmission to Apramycin and Neomycin must be considered high in the first case and moderated in the second because their use without control.

Factores de riesgo asociados a la enfermedad hemorrágica del conejo en poblaciones de conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) en Andalucía

García I.¹, Astorga, R.J.², Napp, S.¹, Huerta, B.², Carbonero, A.², Arenas, A.²

1 Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

2 Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, UCO, Campus Universitarios de Rabanales, 14071, Córdoba

El conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) es uno de los vertebrados más relevantes del ecosistema Mediterráneo. Sin embargo, la llegada y subsiguiente dispersión de la enfermedad hemorrágica del conejo (EHC), ha reducido los niveles poblacionales de estos lagomorfos a niveles críticos en muchas regiones de la Península Ibérica.

Con el objeto de determinar los principales factores de riesgo implicados en la presentación de la EHC, se realizó un estudio seroepidemiológico en poblaciones de conejo silvestre del sur de España aplicando análisis de regresión logística binomial.

Un total de 619 muestras de suero fueron analizadas mediante técnica inmunoenzimática (ELISA indirecto, Ingezim Rabbit 1.7. RHD.K.1®) para determinar la presencia/ausencia de anticuerpos frente al virus de la EHC (variable dependiente). Así mismo, empleando un cuestionario epidemiológico, y con ayuda de sistemas de información geográfica (GIS) se obtuvieron 63 posibles variables explicativas relacionadas con el conejo silvestre, el virus y el medio ambiente.

Se realizó un análisis bivariante para obtener las variables independientes relacionadas con la seropositividad frente al virus de la EHC. Así mismo, se determinó la colinealidad de las variables independientes usando Chi-cuadrado y correlación de Spearman para las variables categóricas y continuas respectivamente. Finalmente, a partir de las variables seleccionadas mediante análisis de regresión logística binomial se desarrolló un modelo predictivo con aquellas variables implicadas en la presentación de la EHC.

La prevalencia de anticuerpos frente al virus de la EHC fue del 29,2% (95% CI: 25,6-32,8) y osciló entre el 7,1% (95% CI: 0-14,8) y el 44,2% (95% CI: 28,8-59,6) en las diferentes áreas estudiadas. El modelo, que presentó un valor predictivo conjunto del 80,1%, incluyó las siguientes variables: seropositividad a mixomatosis, presencia de comederos suplementarios para la caza menor, temperaturas medias máximas, precipitación anual y niveles de zinc en suelo. Estos resultados indican que la presentación de la EHC está relacionada con factores ambientales e indican que medidas de gestión como las campañas de vacunación o la colocación de comederos en diversos puntos para evitar la concentración de animales, podría disminuir la presentación y diseminación de la enfermedad.

[Study of risk factors associated to wild rabbit haemorrhagic disease in wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations from Andalusia]

The wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is regarded one of the most relevant vertebrate species in Mediterranean ecosystems. However, the arrival and subsequent spread of rabbit haemorrhagic disease has caused significant reduction in wild rabbit populations in the Iberian Peninsula.

In order to identify the main risk factors involved in RHD presentation, a seroepidemiological study was performed on wild rabbit populations from southern Spain by using a binomial logistic regression model.

A total of 619 serum samples were analyzed to determinate the presence/absence of antibodies against RHD virus by means of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Ingezim Rabbit 1.7. RHD.K.1®). Likewise, 63 possible explanatory variables related to the host, the RHD virus and the environment were obtained from an epidemiologic questionnaire and geographic information systems (GIS).

A bivariate analysis was performed to relate the myxomatosis serological status (dependent variable) to each explanatory variable. Collinearity between explanatory independent variables was also tested using the chi-square and Spearman's correlation tests for categorical and continuous variables, respectively. Finally, a predictive model for the epidemiology of RHD was developed from the eco-pathological variables selected in the logistic regression analysis.

The prevalence of antibodies against RHD virus was 29.2% (95% CI: 25.6-32.8) and ranged between 7.1% (95% CI: 0-14.8) and 44.2% (95% CI: 28.8-59.6) among the different sampling areas. The logistic regression analysis showed that reproductive activity, myxomatosis seropositivity, supplementary feeding, maximum monthly temperatures, annual accumulated rainfall and zinc level in soil, may predict an 80.1% of the infection by the RHD virus. These results showed that the RHD is associated with environmental factors and indicate that management measures such as vaccination campaigns or the placement of supplementary feeding points to prevent the concentration of animals, could decrease the presentation and dissemination of the disease.

Identificação de helmintes no coelho bravo

Coelho, C., Nóbrega, C., Vala, H.

Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Escola Superior Agrária de Viseu, IPV. Quinta da Alagoa. Estrada de Nelas. 3500-606 Viseu

O coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus*), é uma espécie que desempenha um papel importante na organização e diversidade ecológica na Península Ibérica, uma vez que faz parte da cadeia alimentar de várias espécies, algumas em vias de extinção (Moreno *et al.*, 2004; Delibes-Mateos *et al.*, 2007). Em Portugal, podemos encontrá-lo de Norte a Sul do país, no entanto, a sua densidade populacional tem sofrido um acentuado decréscimo ao longo dos últimos anos (Ferreira, 2003).

As infestações parasitárias alteram o equilíbrio fisiológico do animal, favorecendo uma depressão do sistema imunitário e predispondo a infecções originadas por outros agentes etiológicos. São vários os helmintes que afectam esta espécie animal, provocando efeitos adversos no seu organismo, nomeadamente a destruição dos tecidos e a competição pelos nutrientes que origina atrasos no crescimento animal e, consequentemente na produtividade (Soulsby, 1988).

Este estudo teve por base a necrópsia de sete animais, obtidos numa exploração de coelho bravo da região centro de Portugal, em resultado de morte natural, e teve como objectivo a identificação dos helmintes adultos existentes no estômago e intestino de machos e fêmeas.

O helminte mais frequentemente encontrado, independentemente do sexo do hospedeiro, foi o *Grafitidium strigosum*, o que vai de encontro a outros estudos efectuados (Allan *et al.*, 1999).

Para além de ter sido encontrada uma maior diversidade nas fêmeas, também nestas se verificou um maior número de parasitas adultos presentes.

Todos os helmintes encontrados, pertencem à classe Nematoda e Cestoda. As várias espécies encontradas foram identificadas tendo por base aspectos morfológicos do parasita adulto, bem como o tipo e morfologia dos ovos encontrados nas fezes recolhidas da porção final do tubo digestivo.

Face aos resultados obtidos e que foram similares aos de outros autores (Foronda *et al.* 2003; Foronda *et al.* 2005, Eira *et al.* 2007), pretendemos prosseguir a realização de estudos mais detalhados e que abranjam outras áreas geográficas, no sentido de melhorar a produtividade das explorações e simultaneamente preservar e manter esta espécie animal.

[Helminthe identification in wild rabbit]

The wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is a crucial specie in maintaining the organization and diversity of the ecosystem in Iberian Peninsula, as part of the food chain for many species, some threatened with extinction (Moreno *et al.*, 2004; Delibes-Mateos *et al.*, 2007).

In Portugal, we can find them all over the country, however, its population has suffered a sharp decline over recent years (Ferreira, 2003).

The parasitic infestations alter the animal's physiological balance, depressing the immune system and predisposes to infections caused by other etiologic agents. There are a number of helminths affecting this species, causing adverse effects, including tissues destruction and nutrients competition, that causes delays in animal growth and hence on productivity (Soulsby, 1988).

This study was based on the necropsies of seven animals, of a wild rabbit exploration in the central region of Portugal due to natural death with the purpose to identify adult helminths in the stomach and intestine of males and females.

The helminth most often found, regardless of the sex of the host, was the *Grafitidium strigosum*, as some other studies have shown (Allan *et al.*, 1999).

In females, apart from being found a greater diversity, we also observed a greater number of adult parasites.

All helminths found, are classified in Nematoda and Cestoda Class. The various species were identified based on morphology of the parasite adults, and the type and morphology of eggs found in feces collected from the final portion of the digestive tract.

Given the results, which were similar to those of other authors (Foronda *et al.* 2003; Foronda *et al.* 2005, Eira *et al.* 2007), we intend to pursue the completion of more detailed studies and to cover other areas in order to improve farm productivity and simultaneously preserve and maintain this species.

Agentes infecciosos encontrados em pombos da cidade de Lisboa

Martins, H.M.¹, Rebêlo, E.¹, Gomes, J.¹, Waap, H.¹, Felix, T.¹, Monteiro, M.¹, Carvalho, P.¹, Mendonça, P.¹, Albuquerque, T.¹, Themudo, P.¹, Costa Gomes, L.²

¹ INRB IP, LNV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa
² Câmara Municipal de Lisboa, Divisão de Higiene e Controlo Sanitário

Os pombos podem constituir um risco sanitário grave na medida em que albergam diversos agentes infecciosos, alguns dos quais, como *Salmonella* e *Cryptococcus*, têm potencial para provocar doenças nos Humanos e noutros animais domésticos. Os agentes infectantes estão presentes nas descargas nasais, nas fezes e nos tecidos e órgãos de aves aparentemente saudáveis, podendo ser transmitidos por inalação ou por via fecal-oral. As crianças, os idosos e os indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes com SIDA e oncológicos e as pessoas que vivem em contacto estreito com os pombos, como os columbófilos, devem estar conscientes do risco potencial de transmissão de doenças a partir desses animais. O objectivo deste trabalho foi mostrar a diversidade das bactérias e fungos patogénicos, dando especial ênfase aos que têm potencial zoonótico, assim como os endo e ectoparasitas encontrados em pombos urbanos da cidade de Lisboa. Foram capturados 35 lotes de pombos em diferentes zonas da cidade durante o ano de 2008. Os pombos foram sacrificados e submetidos a análises anatomopatológicas, micológicas, parasitológicas e bacteriológicas. No exame anatomopatológico observou-se um predomínio de lesões ao nível do tubo digestivo, maioritariamente associadas à presença de parasitas. Através dos exames micológicos detectou-se a presença de fungos patogénicos em 31 dos lotes (88.6%). As leveduras mais frequentes foram *Cryptococcus laurentii* (6,5%), *Cryptococcus* spp. (9,7%), *Candida albicans* (25,8%), *Candida krusei* (3,2%), *Candida glabrata* (3,2%), *Zygosaccharomyces* spp. (74,2%) and *Rhodotorula* spp. (3,2%). Os bolores de maior prevalência foram *Aspergillus fumigatus* (45,1%), *Aspergillus flavus* (12,9%), *Aspergillus niger* (6,5%), *Penicillium* spp. (45,1%) e *Fusarium* spp. (6,5%), encontrados nos cecos, pulmões e sacos aéreos. No exame parasitológico foram identificados os seguintes parasitas: *Columbicola columbae* (89,7%), *Pseudolynchia canariensis* (84,6%), *Trichomonas columbae* (84,6%), *Haemoproteus columbae* (84,6%), *Eimeria labbeana* (92,3%), *Ascaridia columbae* (69,2%), *Capillaria columbae* (79,5%), *Dispharynx spiralis* (61,5%), *Tetrameres fissispina* (76,9%), *Raillietina* spp (89,7%), *Brachylaemus commutatus* (61,5%). Os exames bacteriológicos dos pulmões, baços, intestinos e fígados que exibiam lesões revelaram a presença de bactérias patogénicas em 29 lotes (37,2%). As bactérias mais frequentes foram *Mannheimia haemolytica* (34,4%), *Salmonella typhimurium* (25,0%) e *Escherichia coli* (25,0%). Os resultados confirmam o papel relevante dos pombos urbanos como reservatórios e disseminadores de diversos agentes biológicos, alguns dos quais com potencial zoonótico.

[Infectious agents found in pigeons of the city of Lisbon]

Pigeons may pose a serious health hazard, as they harbour different infectious agents. Some of them, like *Salmonella* and *Cryptococcus*, have the potential to produce disease in humans and domestic animals. The infecting organisms are present in nasal discharges, droppings, and tissues of apparently healthy birds and may be transmitted through inhalation or faecal-oral route. Young children, older people and immunocompromised individuals, such as AIDS and cancer patients and people in straight proximity with pigeons, like pigeon breeders, should be aware of the potential risk of disease transmission from these animals. The aim of this work was to show the diversity of pathogenic bacteria and fungi, with particular focus on those with zoonotic potential, as well as endo and ectoparasites found in feral pigeons from the city of Lisbon. A total of 35 batches of pigeons captured from different areas of the city during 2008 were sacrificed and submitted to anatomopathological, bacteriological, mycological and parasitological analysis. Anatomopathological findings were essentially related to the gastrointestinal tract, with a predominance of lesions linked to the presence of parasites. The mycological diagnosis revealed the presence of pathogenic fungi in 31 of the batches (88.6%). Most frequent yeasts were *Cryptococcus laurentii* (6.5%), *Cryptococcus* spp. (9.7%), *Candida albicans* (25.8%), *Candida krusei* (3.2%), *Candida glabrata* (3.2%), *Zygosaccharomyces* spp. (74.2%) and *Rhodotorula* spp. (3.2%). The most prevalent moulds were *Aspergillus fumigatus* (45.1%), *Aspergillus flavus* (12.9%) *Aspergillus niger* (6.5%) *Penicillium* spp (45.1%) and *Fusarium* spp (6.5%), found in the ceca, lungs and air-sacs. Concerning parasites the results were the following: *Columbicola columbae* (89.7%), *Pseudolynchia canariensis* (84.6%), *Trichomonas columbae* (84.6%), *Haemoproteus columbae* (84.6%), *Eimeria labbeana* (92.3%), *Ascaridia columbae* (69.2%), *Capillaria columbae* (79.5%), *Dispharynx spiralis* (61.5%), *Tetrameres fissispina* (76.9%), *Raillietina* spp (89.7%), *Brachylaemus commutatus* (61.5%). Bacteriological examination of samples collected from lung, spleen, intestine and liver showing lesions revealed that 29 batches (37.2%) were positive for pathogenic bacteria. The most prevalent bacteria were *Mannheimia haemolytica* (34.4%), *Salmonella typhimurium* (25.0%) and *Escherichia coli* (25.0%). Results confirm the relevant role of the urban pigeons as reservoir and disseminators of many biological agents, some of which with zoonotic potential.

Rastreo virológico de Carnívoros em Moura Barrancos Natura 2000, SE Portugal

Maldonado, C.¹, Duarte, A.², Leitão, I.¹, Ferreira, J.P.¹, Santos-Reis, M.¹, Tavares, L.²

¹ Centro de Biologia Ambiental/Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

² Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

O sítio Moura-Barrancos é uma das áreas menos perturbadas de Portugal, possuindo habitat adequado para o lince Ibérico (*Lynx pardinus*) e o gato bravo (*Felis silvestris*), duas das espécies portuguesas com estatuto de conservação mais preocupante, enfrentando o primeiro um cenário de pré-extinção. Actualmente Moura-Barrancos é considerado como uma das áreas potenciais para a reintrodução do lince. Por outro lado as doenças virais têm influência na dinâmica populacional das espécies selvagens, podendo mesmo constituir uma importante ameaça para as espécies em perigo. Adicionalmente, certas actividades humanas têm efeitos directos ou indirectos na saúde destas espécies, quer por aumento do contacto com os humanos/animais domésticos, quer pelo stress que as mesmas induzem aumentando a susceptibilidade das referidas espécies a eventuais surtos.

Com o objectivo de avaliar o estado sanitário dos carnívoros silváticos da área de Moura Barrancos, a presença de ácidos nucleicos do Vírus da Esgana (Morbillivirus), do Parvovírus Felino e Canino (Parvovirus) e do Adenovírus canino (Adenovírus) foi determinada a partir de 143 dejectos de raposa (*Vulpes vulpes*, n=31), fuinha (*Martes foina*, n=31), texugo (*Meles meles*, n=29), geneta (*Genetta genetta*, n=23) and sacarrabos (*Herpestes ichneumon*, n=30). Após recolha dos materiais em zonas representativas da área de Moura Barrancos, os ácidos nucleicos virais foram extraídos e as amostras foram testadas por PCR e por RT-PCR para detecção de DNA e RNA viral.

Do conjunto de amostras processadas, uma amostra de geneta e uma amostra de raposa foram consideradas positivas para Parvovírus. As restantes foram negativas para ácido nucleico de Adenovírus Canino e do Vírus da Esgana.

A região genómica amplificada de Parvovírus, incluída no gene VP2, foi sequenciada e a sua sequência nucleotídica, assim como a sequência amino-acídica após tradução, foi alinhada com sequências de Parvovírus previamente descritas por outros autores e acessíveis no Genbank. A análise filogenética revelou a presença de Parvovírus felino amplificado a partir da geneta e a presença de Parvovírus canino amplificado a partir da raposa. A detecção de ácido nucleico de Parvovírus a partir de dejectos de carnívoros permitiu a confirmação destes animais enquanto portadores ou reservatórios do vírus na natureza contribuindo para o conhecimento da epizootologia das doenças virais e para o conhecimento do impacto potencial dos vírus na vida selvagem, otimizando o sucesso de programas de reintrodução animal.

[Virological survey of carnivores in Moura Barrancos Natura 2000 Site, SE Portugal]

Moura-Barrancos site is an area of high conservation value encompassing suitable habitat for the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and for the European wildcat (*Felis silvestris*), two of the more endangered Portuguese species, the first with a pre-extinction scenario. It is also considered an adequate place for future lynx reintroduction. Viral diseases on the other hand may influence the population dynamics of wild species and can threaten the endangered ones. Moreover some human activities have direct and indirect effects in wildlife health whether by increasing the contact between humans/domestic animals and wildlife, or by subjecting populations to stress, increasing their susceptibility to eventual outbreaks.

To evaluate the sanitary state of wild carnivores in Moura-Barrancos area, the presence of canine distemper virus (Morbillivirus), feline and canine parvovirus (Parvovirus) and canine adenovirus (Adenovirus) nucleic acids was determined in 143 stool samples of foxes (*Vulpes vulpes*) (n=31), stone marten (*Martes foina*) (n=31), badger (*Meles meles*) (n=29), common genets (*Genetta genetta*) (n=23), and mongooses (*Herpestes ichneumon*) (n=30), commonly found in the area. The samples were collected in a representative area of Moura-Barrancos and after nucleic acid extraction, were tested by RT-PCR and PCR for detection of viral RNA or DNA.

We found two positive samples for Parvovirus from a common genet and from a fox.

The remaining samples were negative for Canine Adenovirus and Canine Distemper virus nucleic acid.

The parvovirus amplicons, included in the VP2 gene, were sequenced and their nucleotide sequences as well as their predicted amino-acid sequences were aligned with previously reported Parvovirus sequences available in Genbank. The phylogenetic analysis revealed the presence of Feline Parvovirus from the common genet and of Canine Parvovirus from the fox.

The detection of Parvovirus nucleic acids in the stool of carnivores' species confirmed the role of these animals as virus carriers and/or reservoirs providing useful information for the knowledge of viral infectious diseases epizootiology and contributing for the understanding of viral impact in wildlife optimizing the success of reintroduction programmes.

Efeitos colaterais das batidas aos javalis

Mouro, S., Oliveira, M., Vilela, C.L., Niza, M.M.G.R.E.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

As batidas aos javalis (*Sus scrofa*) são frequentes em Portugal, não existindo dados sobre a gravidade das lesões infligidas a cães utilizados nestas batidas. O presente estudo descreve lesões provocadas pelos javalis em cães de caça, caracterizando as feridas nos aspectos clínicos e bacteriológicos.

Foram avaliados 4 casos de agressão por javali a cães. As feridas foram classificadas quanto à sua gravidade, localização, tempo de evolução até à apresentação na consulta (TE) e presença de infeção. As feridas foram agrupadas com base na classificação de Griffin e Holt (2001). As feridas foram consideradas clinicamente infectadas sempre que apresentassem pús ou quando observadas em animais com leucocitose ou febre sem outra origem. Foram ainda consideradas infectadas as feridas com 3 ou mais dos seguintes critérios: eritema, edema, enfisema sub-cutâneo, linfadenite, mau odor ou necrose. Todos os animais foram submetidos a antibioterapia e a tratamento local das feridas. Foi realizada cultura em aerobiose e em anaerobiose estrita sempre que possível. A necessidade de resolução cirúrgica e a evolução clínica foram registadas.

Nos 4 animais em estudos, foi avaliado um total de 11 feridas (média 2.75; mínimo 1; máximo 5), localizadas nos membros (N=4), tórax (N=3) e abdómen (N=2). A maioria das feridas (N=7) consistiam em laceração com penetração da derme, existindo 3 feridas delimitadas ou com laca e/ou avulsão tecidual e uma sem penetração da derme. O TE variou entre 1 e 6 dias. A presença de infeção verificou-se em 2/11 feridas. Dois dos cães tiveram de ser submetidos a tratamento cirúrgico, sendo o caso mais grave o de um cão que com pneumotórax por perfuração da parede torácica e 2 hérnias abdominais traumáticas. A evolução clínica foi positiva em todos os casos. A análise bacteriológica permitiu obter 11 isolados pertencentes a vários géneros, alguns deles com potencial patogénico, nomeadamente *Staphylococcus* spp (N=3), *Streptococcus* spp. (N=3) e *Pasteurella* spp. (N=2). Discute-se a abordagem médica e a antibioterapia a estabelecer em casos futuros com base nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (N=10) realizados.

[Side effects of wild-boar hunting]

Wild boar (*Sus scrofa*) hunting is frequent in Portugal, but no data is available on lesion severity of the hunting dogs. The present study describes the lesions caused by wild boars to hunting dogs; wounds were evaluated for clinical and bacteriological features.

Four cases of aggression were evaluated. Wounds, grouped according to Griffin e Holt (2001) classification, were characterised for severity, anatomic location, evolution time from aggression to presentation (TE) and presence of infection. The criteria adopted to establish wound clinical infection were the presence of one major sign (pus, fever or leukocytosis), or at least three minor signs: erythema, oedema, subcutaneous emphysema, tissue necrosis, and malodour. All dogs were submitted to systemic antibiotherapy and local treatment of wounds. Swabs were taken for aerobic and strict anaerobe culture. The requirement for surgical intervention and the clinical evolution were also registered.

A total of 11 wounds were evaluated in the 4 animals under study (average 2.75; minimum 1; maximum 5). Wounds were located in the limbs (N=4), thorax (N=3) and abdomen (N=2). The majority of wounds (N=7) consisted on laceration with dermis penetration; 3 were lacerations or puncture wounds with tissue avulsion or dead space and 1 showed no dermis penetration. ET ranged from 1 to 6 days. Infection was detected in 2 of the 11 wounds. Two of the dogs were submitted to surgery, the most severe case being pneumothorax and 2 abdominal traumatic hernias. All animals recovered. Bacteriology allowed for the identification of 11 isolates, from different genera, some with a zoonotic potential, namely *Staphylococcus* spp (N=3), *Streptococcus* spp. (N=3) and *Pasteurella* spp. (N=2). The medical approach and the treatment protocol are discussed, based on susceptibility testing results.

Melanoma labial numa Juliana (*Pollachius pollachius*)

Marques Pereira, N.^{1,2}, Faísca, P.¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, ULHT

² Oceanário de Lisboa

Dados clínicos: Em Julho de 2008, detectou-se um nódulo numa Juliana (*Pollachius pollachius*) do tanque do Atlântico Norte do Oceanário de Lisboa (ODL).

O nódulo localizado na parte lateral esquerda do lábio inferior com cerca de 3 cm de largura e 2 cm de altura era de cor preta heterogénea e ulcerado. Dois meses depois da primeira visualização, optou-se pela sua transferência para o tanque de observação e tratamento com o intuito de se realizar a extirpação cirúrgica do nódulo. O peixe morreu imediatamente após a transferência.

Necrópsia: O nódulo localizado na porção externa do lábio era exofítico, séssil, focalmente ulcerado e mal delimitado dos tecidos adjacentes, estendendo-se ventralmente para os tecidos circundantes. Ao corte apresentava uma coloração preta heterogénea de consistência firme e margens mal definidas.

O peixe com 4,3 kg de peso, apresenta-se em mau estado geral, com lesões cutâneas erosivas crónicas na face lateral e na barbatana caudal com excesso de produção de muco. Na cavidade celómica, o fígado apresentava na extremidade do lobo caudal vários focos bem delimitados (o maior com 1 cm de diâmetro) de estatose. O estômago e o intestino apresentavam congestão difusa da mucosa, e o baço e o rim apresentam uma hiperplasia dos centros melanomacrofágicos.

Não foram observadas imagens de metastização quer à necrópsia quer na análise microscópica dos órgãos analisados.

Histopatologia do nódulo: O nódulo foi fixado em formol tamponado a 10% e foram preparadas lâminas segundo as técnicas histológicas de rotina para hematoxilina-eosina e Fontana Masson. O exame histopatológico nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina revelou uma proliferação celular neoplásica não encapsulada e mal delimitada dos tecidos adjacentes. Multifocalmente observaram-se agregados circulares de células grandes redondas fortemente pigmentadas, intercaladas numa população de células fusiformes, menos pigmentadas, e que se organizavam em feixes curtos num padrão em zigzag (“herringbone”). As células fusiformes tinham um citoplasma acidófilo claro com núcleo central ovóide com a cromatina finamente granular e sem nucléolo evidente. No citoplasma apresentavam pequenas quantidades de um pigmento castanho escuro sob a forma de poeira ou pequenos grãos. Foram observadas poucas figuras de mitose, anisocitose ou anisocariose.

As lâminas coradas com o Fontana Masson coraram positivamente o pigmento melânico dos agregados de células redondas assim como puseram em evidência a pigmentação melânica citoplasmática das células fusiformes.

Conclusão: A imagem histológica é compatível com um melanoma maligno.

Do nosso conhecimento este é o primeiro caso de melanoma maligno com localização labial descrito numa Juliana (*Pollachius pollachius*).

[Labial melanoma in a Pollack (*Pollachius pollachius*)]

Clinical Data: In July 2008, a nodule in the lower lip of a Pollack (*Pollachius pollachius*) living in captivity in the North Atlantic aquarium of the Oceanário de Lisboa (ODL), was first seen.

The nodule was 3 cm large and 2 cm tall located in the lower lip, and was heterogeneously black.

Two months later, the fish was transferred with the purpose of removing the nodule, but it died immediately after the transfer.

Necropsy: The nodule was exophytic, sessile, locally ulcerated, and poorly demarcated from the adjacent tissues.

The fish weighted 4,3 kg, and was in poor body condition, with chronic erosive lesions on the skin. In the celomic cavity the liver showed two foci of estatois and the spleen and kidney presented melanomacrophage hyperplasia.

No evidence of metastasis was seen in the macroscopic and microscopic analysis.

Histopathology: Tissue samples were placed in 10% neutral buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin and eosin and Fontana Masson.

Histopathological examination revealed an unencapsulated, poorly-circumscribed, moderately cellular neoplasm. Scattered throughout the neoplasm with variable density were large round cells heavily pigmented, organized in nests, which were interspersed with a population of spindle cells arranged in a prominent “herringbone” pattern. The neoplastic spindle cells had scant eosinophilic cytoplasm, with small centrally located vesicular nuclei and no nucleoli. Melanin pigment of these cells showed a dust-like or granular dispersion throughout the cytoplasm. Anisocytosis, anisokaryosis, and mitoses were minimal.

With the Fontana Masson staining, the melanin pigment was highlighted in the cytoplasm of both cell types.

Conclusion: The histological images are compatible with a malignant melanoma.

Of our knowledge this is the first reported case of a malignant melanoma with labial location in a Pollack (*Pollachius pollachius*).

Carcinoma micropapilar invasor da glândula mamária canina e felina: uma entidade sub-diagnosticada?

Gama, A.¹, Seixas, F.¹, Alves, A.¹, Pires, M.A.¹, Lopes, C.^{2,3}, Schmitt, F.^{4,5}

1 CECAV, Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 Departamento de Patologia Molecular e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Largo Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

3 Departamento de Patologia, Instituto Português de Oncologia, R. Dr. Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

4 Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP), R. Roberto Frias, S/N, Porto

5 Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto

Na mulher, o carcinoma micropapilar invasor da mama constitui um subtipo de carcinoma ductal invasor, tendo sido proposto como uma entidade morfológicamente distinta em 1993, por Siriaunkgul e colaboradores, sendo geralmente associado a mau prognóstico. Apesar de maioritariamente baseada em critérios descritivos, a classificação da OMS para os tumores mamários do cão e do gato não reconhece o padrão micropapilar. Até ao presente, são escassos os carcinomas mamários caninos e felinos descritos com este padrão morfológico. Neste estudo, os autores descrevem carcinomas mamários da cadela e da gata com características histológicas idênticas ao carcinoma micropapilar invasor da mama da mulher. À observação microscópica, estes carcinomas apresentavam um padrão micropapilar predominante (mais de 50% do tumor), caracterizado por pequenos agregados papilares avasculares (sem estroma conjuntivo) dispostos em lacunas, mimetizando permeação linfática. A maioria dos casos exibiu alto grau histológico, invasão estromal, permeação vascular e metastização ganglionar. O estudo de sobrevivência revelou que os animais afectados desenvolveram doença oncológica num período de cinco meses após cirurgia.

Considerando que este padrão histológico está associado com um comportamento biológico muito agressivo, propomos o "Carcinoma Micropapilar Invasor" como uma nova entidade na classificação dos tumores de mama da cadela e da gata.

[Invasive micropapillary carcinoma of canine and feline mammary gland: an under recognized entity?]

Invasive micropapillary carcinoma of the human breast is a subtype of invasive ductal carcinoma proposed as a morphologically distinctive form by Siriaunkgul et al. in 1993, which is usually associated with lymph node metastasis and poor prognosis. Although the WHO classification of canine mammary gland tumours is based on descriptive criteria, it does not recognize the micropapillary pattern, which is being included in the papillary tumour subtype.

In this study, the authors report several carcinomas of the canine and feline mammary gland displaying histologic features that correspond to IMC of human breast. Until now, only a few number of cases with this morphologic pattern were described in canine and feline mammary gland tumours. Studying a large series of canine and feline mammary gland tumours, we found invasive carcinomas displaying more than 50% of a micropapillary pattern, which defines an IMC. Microscopically, these tumours were characterized by papillary cell clusters surrounded by empty lacunar spaces. Most cases were high grade carcinomas, associated with stromal invasion, lymphovascular tumour emboli and the presence of regional lymph node metastases. Follow up analysis revealed that both bitches and queens developed progressive disease within a five month period after surgery and died or were euthanized in this period.

Considering that this specific invasive pattern was associated with such an aggressive behaviour, we propose the recognition of "Invasive Micropapillary Carcinoma" as a novel entity in the classification of canine and feline mammary gland tumours.

Tumor filóide da mama da cadela e da gata

Seixas, F.¹, Gama, A.¹, Pires, M.A.¹, Alves, A.¹, Schmitt, F.^{2,3}, Lopes, C.^{4,5}

1 CECAV, Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP), R. Roberto Frias, S/N, Porto

3 Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto

4 Departamento de Patologia Molecular e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Largo Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

5 Departamento de Patologia, Instituto Português de Oncologia, R. Dr. Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

O tumor filóide, antigamente denominado cistosarcoma filóide, é um tumor bifásico análogo ao fibroadenoma, caracterizado por proliferação epitelial rodeada por um estroma neoplásico, hiper celular, que forma estruturas foliáceas. É um tumor heterogéneo e, dependendo das características do componente estromal, apresenta aspectos morfológicos que variam de lesões similares a fibroadenomas até sarcomas. É a quantidade e a aparência do estroma que determina se a lesão deve ser classificada de fibroadenoma ou tumor filóide, e, em última análise, que determina se o tumor é benigno, maligno ou border-line e se o seu comportamento biológico é bom ou mau.

Nos países ocidentais o tumor filóide representa 0,3-1% da totalidade dos tumores primários e 2,5% dos tumores fibroepiteliais da mama da mulher. De acordo com a bibliografia consultada, os tumores filóides não foram ainda referenciados na mama da cadela e da gata, apesar de já ter sido publicado um caso em bexiga de rato. Neste trabalho os autores descrevem 6 casos de neoplasias de mama de cadela e de gata obtidos do arquivo do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica, que apresentam características morfológicas idênticas às descritas nos tumores filóides da mama da mulher.

[Phyllodes tumour of the canine and feline mammary gland]

Phyllodes tumours (PT), formerly designated as cystosarcoma phyllodes, are a group of biphasic tumours, basically analogous to fibroadenomas, characterized by a double layered epithelial component surrounded by an overgrowing hypercellular mesenchymal component typically organized in leaf-like structures. It is a heterogeneous tumour type, and depending on the bland or overtly sarcomatous characteristics of their mesenchymal component, PT displays a morphological spectrum lying between fibroadenomas and pure sarcomas. It is the amount and appearance of the stromal component that determines whether the neoplasia should be called a fibroadenomas or a Phyllodes tumours and, in latter instance, what the chances are of the tumour behaving clinically in an aggressive fashion.

In western countries, PTs account for 0.3-1% of all primary tumours and for 2.5% of all fibroepithelial tumours of the breast in women. As far as we know mammary PTs have not been reported in the veterinary literature, although it was already reported in the mouse urinary bladder. Here we describe 6 cases of PTs of the canine and feline mammary gland observed in the files of Histopathology Laboratory of the University of Trás-os-Montes e Alto Douro.

Cistadenoma ovárico bilateral em burras

Quaresma, M.¹, Pires, M.A.² e Payan-Carreira, R.²

¹ Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

² CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

Os tumores epiteliais do ovário são raros em equinos. Existem descrições esporádicas de estruturas quísticas encontradas incidentalmente em apenas um dos ovários de éguas. Os casos descritos referem a existência de um ovário de dimensões aumentadas, evidenciando vários quistos de dimensões variáveis, contendo fluído claro ou amarelado. A gênese destes quistos pode ser uma proliferação do epitélio da fossa de ovulação; foi ainda proposto que possam ter origem no epitélio das fimbrias, que no decorrer do tempo, com ovulações sucessivas, possa ter ficado retido na área de ovulação. São habitualmente situações benignas, não activas do ponto de vista endócrino, e que possuem um diminuto potencial proliferativo o metastático. Na égua são unilaterais e podem interferir com a fertilidade quando invadem a zona de ovulação. Neste trabalho pretendemos fazer uma descrição dos aspectos ecográficos e das características anatomo-patológicas de cistadenomas ováricos bilaterais diagnosticados em cinco burras de raça Terras de Miranda, com idades compreendidas entre os 12 e os 24 anos. Em todos os animais foi detectada a existências de múltiplas estruturas quísticas nas imediações da fossa ovárica, que conferiam um aspecto arredondado ao ovário, aumentando-lhe as dimensões. De acordo com as informações fornecidas pelos proprietários, os animais mantinham-se acíclicos. Os animais foram submetidos a uma segunda avaliação, distanciada no tempo mais de um mês. O aspecto ecográfico dos ovários manteve-se inalterado. Alguns dos animais foram posteriormente eutanasiados, por motivos diversos, e o seu tracto reprodutivo recolhido para exame anatomopatológico. Macroscopicamente observou-se a existência de múltiplos quistos de paredes finas, por vezes desenvolvendo-se no interior de outros quistos, dispostos na zona da fossa ovárica, e com dimensões entre os 0,2 e os 3 cm de diâmetro. Histologicamente, estas estruturas encontram-se revestidas de epitélio cúbico ou colunar, disposto numa camada única a tripla, contendo material proteináceo. De acordo com estas características, o diagnóstico para esta situação foi de cistadenoma ovárico bilateral.

[Bilateral cystadenoma in donkey ovaries]

Epithelial cell tumours in the mare ovary are rare; sporadic report exists on unilateral cystadenoma, and descriptions refer to enlarged ovaries, presenting multiple large cysts containing clear to yellowish fluid. These masses have been proposed to originate from ovulation fossa epithelia or from oviductal epithelia that could be grasped during ovulation. These are considered to be benign, not hormonally active tumours, which presents a reduced proliferation rate and a reduced metastatic potential. In the mare, they usually are unilateral. Due to their localization around the ovulation fossa, they may compromise fertility in the mare. In this work we aim to describe the ultrasonographic and both the gross and histological features bilateral ovarian cystadenoma found in jennet ovaries. This condition was diagnosed in 5 Terras de Miranda jennets with ages ranging from 12 to 24 years old; in all the animals bilateral multiple cystic structures were detected nearby the ovulation fossa. These animals were reported to be in anoestrous by their owners. The situation was re-evaluated a seconde time after its diagnosis, using the ultrasonography, with intervals greater than a month. The ultrasonographic image of the ovaries remained unchanged. Some of the ovaries were collected post-mortem and a histopathological exam was performed. On gross examination multiple cysts ranging from 0.2 to 3 cm were observed around the ovulation fossa in both the ovaries; occasionally smaller cysts developing inside larger cysts were saw. Histologically, these cysts are lined by a single or duple layer of cuboidal or columnar epithelial cells, and contain proteinaceous matherial. According to this features, cystic ovarian condition in those jennets was diagnosed as ovarian cystadenoma.

Vacuolização disseminada das células glandulares prostáticas do cão – a propósito de um caso

Silva, J.F.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade

A vacuolização das células glandulares da próstata canina foi referida por Bloom (1) como rara e ocorrendo em casos de hiperplasia benigna. Num estudo mais recente, foram observados pequenos focos de vacuolização de células glandulares em próstatas caninas hiperplásicas, com incidência pouco frequente, mas não rara (2).

O presente estudo refere-se a um cão, de raça indeterminada, com cerca de 17 anos, que apresentava um adenocarcinoma das glândulas hepatóides com metástases nos linfonodos escrotais e ilíacos. A próstata mostrava um ligeiro grau de atrofia, mantendo a forma bilobada.

Ao exame histológico de rotina (coloração pela hematoxilina e eritrosina), notaram-se áreas de alvéolos normais ou hiperplásicos e focos de atrofia lobular, por vezes com hiperplasia das células basais. Notaram-se também áreas extensas de hiperplasia pós-atrótica. Observou-se vacuolização extensa das células acinosas nos alvéolos normais/hiperplásicos e nos ácinos com hiperplasia pós-atrótica, que apresentavam um volumoso vacúolo citoplásmico que empurrava o núcleo basalmente e os grânulos de secreção exócrina para o ápex das células glandulares. Estes vacúolos eram PAS-negativos e também não coravam pelo azul Alcian. Foi feito o estudo imunocitoquímico com anticorpos anti-citoqueratinas (MNF116 e 34βE12), anti-vimentina (Vim3B4) e anti-actina (HHF35), todos da Dako®. O anticorpo 34βE12 permitiu a visualização das células basais, que não foram atingidas pelo processo de vacuolização. As células basais não foram marcadas pelo Vim3B4 e HHF35, o que indica que não houve metaplasia mioepitelial.

Este processo de vacuolização poderá, em algumas ocasiões, ser confundido com a metaplasia mucinosa (3) em observação de cortes corados pelo método de rotina. Contudo, nesta última afeção, o citoplasma apresenta vários pequenos vacúolos positivos ao PAS e ao azul Alcian. Também se pode excluir uma possível natureza neoplásica maligna, devido à manutenção das células basais (4).

Referências:

1. Bloom F (1954). Pathology of the Dog and Cat (The Genitourinary System, with Clinical Considerations). American Veterinary Publications, Inc., Evanston, Illinois (E.U.A.). pp. 292-293.
2. Silva JF (1996). Aspectos Morfológicos, Citofotométricos e Imunocitoquímicos da Próstata Canina. Tese de Doutoramento, FMV-UTL, Lisboa.
3. Koren R, Perl S, Zajdel L, Paz A, Oberkleid OE, Nyska A & Gal R(1998). Mucinous metaplasia in dogs prostate and its anatomical distribution. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149: 313-318.
4. Kahane H, Sharp JW, Shuman GB, Dasilva G & Epstein JI (1995). Utilization of high molecular weight cytokeratin on prostate needle biopsies in an independent laboratory. *Urology*, 45: 981-986.

[Disseminated vacuolization of canine prostatic glandular cells - report of a case]

Vacuolization of canine prostatic gland cells was referred by Bloom (1) as rare and occurring in cases of benign hyperplasia. In a more recent study, small foci of glandular cell vacuolization were observed in some cases of canine benign prostatic hyperplasia. That foci were infrequent but not rare (2).

The present study refers to a 17 year-old mongrel dog, which harboured a hepatoid gland adenocarcinoma with metastases in the scrotal and iliac lymph nodes. The prostate gland showed a slight degree of atrophy, maintaining a bilobated shape.

In the routine histologic examination (haematoxylin and erythrosin staining), there were areas of normal or slightly hyperplastic alveoli and foci of lobular atrophy, these latter showing sometimes basal cell hyperplasia. Areas of post-atrophic hyperplasia were also present. There was disseminated vacuolization of the exocrine cells in the normal/hyperplastic alveoli and in the acini of areas of post-atrophic hyperplasia. Those cells presented a voluminous intracytoplasmatic vacuole which dislodged the nucleus basally and the secretory granules to the apex of the glandular cells. Those vacuoles were PAS and Alcian blue negative. An immunocytochemical study was performed with anti-cytokeratin (MNF116 and 34βE12), anti-vimentin (Vim3B4), and anti-actin (HHF35) antibodies (Dako®). Antibody 34βE12 labelled basal cells, which were not vacuolized. Basal cells were not stained by antibodies Vim3B4 and HHF35, which demonstrated they did not suffer myoepithelial metaplasia.

In routinely stained sections, this process of vacuolization could be, in some instances, mistaken for mucinous metaplasia (3). However, in the mucinous metaplasia, the cytoplasm of the glandular cells shows several little PAS and Alcian blue positive vacuoles. Another conclusion to draw is that this prostatic alteration has not a malignant nature, due to the presence of the basal cells (4).

Bibliography: 1. Bloom F (1954). Pathology of the Dog and Cat (The Genitourinary System, with Clinical Considerations). American Veterinary Publications, Inc., Evanston, Illinois (E.U.A.). pp. 292-293. 2. Silva JF (1996). Aspectos Morfológicos, Citofotométricos e Imunocitoquímicos da Próstata Canina. Tese de Doutoramento, FMV-UTL, Lisboa. 3. Koren R, Perl S, Zajdel L, Paz A, Oberkleid OE, Nyska A & Gal R(1998). Mucinous metaplasia in dogs prostate and its anatomical distribution. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149: 313-318. 4. Kahane H, Sharp JW, Shuman GB, Dasilva G & Epstein JI (1995). Utilization of high molecular weight cytokeratin on prostate needle biopsies in an independent laboratory. *Urology*, 45: 981-986.

Um caso de carcinoma gástrico com metaplasia óssea num cão

Amorim, I.¹, Gärtner, M.F.², Faustino, A.M.R.¹, Gil da Costa, R.M.¹, Dias Pereira, P.¹

¹ Instituto de Ciência Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto

² Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

Os tumores gástricos representam menos de 1% das neoplasias caninas. O carcinoma é a neoplasia gástrica canina mais frequente, seguido de linfomas e tumores de células musculares lisas. Segundo a OMS, os carcinomas gástricos caninos são subclassificados em tubulopapilar, mucinoso, em anel de sinete e indiferenciado. A classificação humana inclui ainda o carcinosarcoma (com ambos os componentes epiteliais e mesenquimatosos malignos, com ou sem diferenciação condróide/óssea) como uma neoplasia rara.

A metaplasia óssea é um achado raro em neoplasias epiteliais gástricas, sendo poucos os casos documentados na medicina humana. A sua patogénese permanece incerta, porém reconhecem-se alguns factores tumorais com propriedades osteogénicas, tais como citocinas, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e factores de crescimento, que podem estar envolvidos na formação deste tecido, tanto no seio do tumor como nas lesões metastáticas. Alguns estudos sugerem a origem directa da metaplasia óssea a partir das células epiteliais neoplásicas, enquanto outros especulam que poderá resultar de fibroblastos estromais.

Segundo a literatura, BMPs -2, -4 e -6 possuem elevado potencial osteoindutor, influenciando a formação óssea, a indução de osso heterotópico, a regeneração óssea e cicatrização.

Este relato descreve um caso de um carcinoma gástrico com metaplasia óssea num caniche macho com 8 anos de idade.

Através de laparotomia exploratória, uma massa amarelada nodular, localizada no piloro, com bordos irregulares e limites indistintos, foi removida e submetida a exame histológico. Após o processamento de rotina, as amostras foram coradas com HE e submetidas a imunohistoquímica, empregando os anticorpos monoclonais anti-pan-citoqueratina (AE1/AE3), vimentina, alfa-actina muscular e BMP 2/4.

Histologicamente, a massa consistia numa proliferação neoplásica multinodular de células epiteliais bem diferenciadas, organizadas em estruturas tubulares ou acinares, suportadas por estroma esquizoso, que se estendia desde a mucosa até às camadas musculares subjacentes. O índice mitótico era elevado (6 figuras de mitose por campo de grande ampliação), algumas das quais atípicas. Foram observadas numerosas imagens de êmbolos epiteliais neoplásicos, bem como múltiplos focos de ossificação metaplásica, tanto na mucosa como nas camadas musculares, consistindo em tecido ósseo maduro rodeado por células epiteliais neoplásicas sem sinais de atipia citológica ou figuras de mitose. As células neoplásicas apresentaram imunorreatividade para a AE1/AE3 e BMPs, mas não para a vimentina ou alfa-actina, enquanto as células ósseas revelaram apenas fraca imunexpressão citoplasmática para BMP 2/4.

A metaplasia óssea é um achado raro em neoplasias epiteliais gástricas, com apenas poucos casos relatados em seres humanos. Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro relato de um carcinoma gástrico com metaplasia óssea num cão.

O painel imunohistoquímico aplicado demonstrou claramente a natureza epitelial da neoplasia. Além disso, o fenótipo não-neoplásico dos focos de metaplasia óssea, exclui um possível diagnóstico de carcinosarcoma.

Os achados histopatológicos e imunohistoquímicos desta lesão, particularmente a imunomarcagem com BMP, sugere que o tecido ósseo é proveniente das células epiteliais neoplásicas que directamente circunscrevem os focos de metaplasia óssea.

[A case of gastric carcinoma with osseous metaplasia in a dog]

Gastric tumours account for less than 1% of all reported neoplasms in dogs. Carcinoma is the most frequent canine gastric neoplasm, followed by smooth muscle tumours and lymphomas. According to the World Health Organization, canine gastric carcinomas are subdivided into tubulopapillary, mucinous, signet-ring and undifferentiated types. The human classification also includes carcinosarcoma (with both epithelial and mesenchymal malignant components, with or without chondroid/osseous differentiation) as a rare neoplasm.

Osseous metaplasia is a rare finding in gastric epithelial neoplasms, with only very few cases reported in humans. The pathogenesis remains unclear, however there are some recognized tumour related factors with osteogenic properties, namely cytokines, bone morphogenetic proteins (BMP) and growth factors, that may be involved in the formation of osseous areas both within the tumour and in metastatic lesions. Some studies suggests direct osseous metaplasia from carcinoma cells, while others speculate it may derive from stromal fibroblasts.

According to the literature, BMPs -2, -4 and -6 exert high osteoinductive potential, influencing bone formation, heterotopic bone induction, bone regeneration and healing.

This report describes a case of a gastric carcinoma with osseous metaplasia in a 8-year-old male standard poodle.

An exploratory laparotomy confirmed a firm yellowish nodular mass, located in the pyloric region, with irregular borders and indistinct limits. The lesion was surgically removed and submitted for current histological examination. Tissues samples were routinely processed, dehydrated and embedded in paraffin wax. Consecutive 4µm-sections were cut, stained with HE and immunohistochemistry employing the monoclonal antisera pan-cytokeratin (AE1/AE3), vimentin, muscular a-actin and BMP 2/4, using a polymer based detection system.

Histologically, the mass consisted of a multinodular neoplastic proliferation of well-differentiated epithelial cells, arranged in a tubular or acinar pattern and supported by scirrhous stroma, extending from mucosa to muscular layers. Mitotic figures were frequent (6 mitotic figures per high power field) some of which were atypical. Multiple neoplastic epithelial emboli were also observed. Multiple foci of metaplastic ossification, consisting of osteoid and fully matured bone tissue, surrounded by neoplastic epithelial cells, were identified both in the mucosa and muscular layers. Neither cytological atypia nor mitotic figures were found in those osseous foci. Neoplastic cells showed immunoreactivity for the citokeratin and BMPs but not for vimentin or a-actin while bone cells only showed weak cytoplasmic immunexpression for BMP 2/4.

Osseous metaplasia is a rare finding in gastric epithelial neoplasms, with only few cases reported in humans. To the best of our knowledge this is the first report of gastric carcinoma with osseous metaplasia in a dog.

The immunohistochemistry clearly showed the epithelial nature of the neoplasia. Moreover, the non-neoplastic phenotype of the osseous foci, ruled out a possible diagnosis of carcinosarcoma.

Histopathological and immunohistochemical features of this lesion, particularly the positive immunostaining for BMP, suggests that the bone tissue derived directly from neoplastic epithelial cells that circumscribe the osseous metaplasia foci.

As células Mato retinianas acumulam ferritina e podem desempenhar um papel central na homeostasia do ferro

Mendes-Jorge, L.¹, Ramos, D.², Luppó, M.^{2,3}, Llombart, C.^{2,3}, Alexandre-Pires, G.¹, Nacher, V.^{2,3,7}, Melgarejo, V.², Correia, M.⁵, Navarro, M.^{2,3,7}, Carretero, A.^{2,3,7}, Tafuro, S.^{2,7}, Rodriguez-Baeza, A.⁶, Bosch, F.^{2,4,7}, Esperança-Pina, J.A.⁵ e Ruberte, J.^{2,3,7}

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; 2 Centro de Biotecnologia Animal y Terapia Génica (CBATEG), Universidad Autónoma de Barcelona; 3 Departamento de Sanidad Animal y Anatomía, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona; 4 Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona; 5 Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa; 6 Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona; 7 CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona

Objectivos: A necessidade de ferro no metabolismo prende-se com o facto deste elemento estar presente na constituição de várias enzimas envolvidas de forma ubíqua nos sistemas moleculares. Especificamente, a retina requer ferro devido à enzima guanilato ciclase que assegura a síntese de cGMP, segundo mensageiro na cascata de fototransdução. A acumulação de ferro na retina está, no entanto, associada a inúmeras doenças degenerativas. Sabe-se que os macrófagos funcionam como grandes depósitos de ferro em situações de excesso deste elemento no organismo. Contudo, a função dos macrófagos retinianos no metabolismo do ferro permanece desconhecida. **Metodologias:** O conteúdo em ferro foi analisado por meio de microanálise por energia dispersiva por radiação-X (EDX) para microscopia electrónica de transmissão. Retinas imunohistoquimicamente marcadas para os receptores de ferritina TIM-2 e para ferritina foram observadas por meio de microscopia de varrimento laser confocal. Após a injeção endovenosa de ferritina de baço de cavalo, em murganhos ICR, a presença de ferritina na retina foi detectada através do seu conteúdo em ferro por meio da reacção do azul da Prússia. **Resultados:** A microanálise EDX detectou ferro nas vesículas endocíticas das células Mato, mas também revelou que os seus lisossomas acumulavam uma quantidade significativamente maior de ferro que qualquer outra estrutura retiniana analisada. Nos lisossomas, o meio ácido, determina a separação das moléculas de ferro da transferrina e o seu transporte para o citoplasma. Contudo, nas células Mato este mecanismo não se verifica. Inversamente, o ferro acumula-se nos lisossomas. A ferritina, considerada tradicionalmente como uma proteína de armazenamento de ferro, foi, recentemente, proposta como uma nova proteína transportadora deste elemento. A ferritina pode conter mais de 4500 átomos de ferro, enquanto a transferrina pode albergar no máximo 2, e, atravessando o endotélio, pode disponibilizar livremente ferro às células retinianas. As células endoteliais e as células Mato revelaram uma forte expressão de receptores TIM-2, sugerindo que a ferritina se pode ligar a estas células. Mais, a presença de ferritina foi observada em grânulos citoplasmáticos das células Mato. Para determinar se a ferritina acumulada nas células Mato podia ter origem sanguínea, injectámos ferritina de baço de cavalo em murganhos saudáveis. Seis horas após, a ferritina foi observada em células perivasculares com uma topografia compatível com a das células Mato. Estes resultados mostram que as células Mato podem acumular ferritina de origem sanguínea, provavelmente, através dos receptores TIM-2. Este mecanismo, para além de poder constituir uma nova via de transporte de ferro para a retina, evidencia um papel chave das células Mato no armazenamento e na homeostasia do ferro a nível retiniano.

[Retinal Mato cells can store ferritin and may have a central role in iron homeostasis]

Objective: The general requirement for iron in cellular metabolism is due to its involvement in various heme and non-heme-containing enzymes, which are ubiquitously involved in molecular systems. The retina specifically requires iron because the iron-containing enzyme guanylate cyclase assures the synthesis of cGMP, which acts as the second messenger in the phototransduction cascade. However, iron accumulation is associated with several retinal degenerative diseases. Macrophages serve as a large storage depot for iron excess in the body. Nevertheless, the function of retinal macrophages in iron metabolism remains unknown. **Methods:** The iron content of retinal Mato cells was analysed by energy dispersive X-ray (EDX) microanalysis. Retinas immunohistochemically labelled for TIM-2 ferritin receptor and for ferritin were studied by means of laser-scanning confocal microscopy. Horse spleen ferritin was intravenously injected in healthy ICR adult mice and ferritin was detected by its iron content with the Prussian blue reaction. **Results:** EDX microanalysis detected iron in Mato cell endocytic coated vesicles but also revealed that retinal Mato cell lysosomes significantly accumulate iron in comparison with all the other retinal structures analysed. However, in the lower pH of lysosomes, iron is released from transferrin and transported to the cytoplasm, mechanism that cannot explain the accumulation of iron in Mato cell lysosomes. Recently ferritin, considered traditionally as an iron storage protein, was proposed as a new possible iron delivery protein. Ferritin is a normal constituent of blood serum and can store up to 4,500 iron atoms, whereas transferrin contains only a maximum of 2 iron atoms. Ferritin is transported across retinal endothelial cells, suggesting that is freely available to retinal cells. Both endothelial and Mato cells highly expressed the TIM-2 receptor, suggesting that these cells may bind ferritin. Moreover, ferritin was observed in cytoplasmic granules in retinal Mato cells. To determine whether ferritin stored in Mato cells has a blood-borne origin, horse spleen ferritin was intravenously injected into healthy mice. Six hours after injection, horse spleen ferritin was found in perivascular cells in a position and distribution compatible with that of Mato cells. Overall these findings suggest that retinal Mato cells may have a role in iron homeostasis. Retina obtains iron from the circulation and it is accepted that transferrin is the main iron-transporter. However, our study suggests that retinal Mato cells can accumulate blood-borne ferritin, probably through TIM-2 receptor binding. This could represent a new pathway of iron delivery in the retina and points out Mato cells as a key element in retinal iron storage.

Estudo metabólico e histopatológico das lesões renais observadas em ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF), um modelo experimental de Diabetes Tipo 2

Teixeira de Lemos, E.^{1,2}, Vala, H.^{1,3}, Reis, F.², Baptista, S.², Piloto, N.², Garrido, P.², Carvalho, L.⁴, Teixeira, F.²

1 ESAV, Instituto Politécnico de Viseu. Viseu

2 Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

3 Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

4 Instituto de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

A nefropatia diabética tem sido responsabilizada pelo aumento da incidência de insuficiência renal crónica registada nas últimas décadas. O conhecimento e compreensão das características da nefropatia, associada aos fenómenos de disglucemia, têm vindo a ser dificultados pela falta de modelos animais capazes de reproduzir esta patologia. Todavia, os ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF (fa/fa)) apresentam um desenvolvimento da diabetes tipo 2 muito semelhante ao que ocorre no homem, exibindo igualmente nefropatia diabética progressiva.

Este trabalho teve como objectivo principal avaliar e caracterizar a evolução das alterações metabólicas e renais, em ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF) com insulino-resistência. Neste estudo foram avaliados ratos ZDF (fa/fa) e o seu controlo ZDF (+/+) entre as 8 e as 20 semanas de idade. Semanalmente foram avaliados os pesos corporais e as pressões artérias sistólica e diastólica. Oito animais de cada grupo foram sacrificados aleatoriamente às 8 (S8) e às 20 (S20) semanas de idade. No sangue, soro e plasma recolhidos foram efectuadas as seguintes determinações: glicemia, HbA1c, insulina, triglicéridos, colesterol total, ureia e creatinina. Foram avaliados biomarcadores de stresse oxidativo: peroxidação lipídica, ácido úrico e 3-nitrotirosina. Os rins, recolhidos imediatamente após o sacrifício, foram pesados e submetidos às técnicas histológicas de rotina, utilizando-se coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E) e de Ácido Periódico de Schiff (PAS). As porções remanescentes do órgão foram homogeneizadas e nelas foi avaliada a peroxidação lipídica. Às 8 semanas de idade, nos ratos ZDF (fa/fa) todos os parâmetros avaliados apresentaram já valores superiores aos dos animais do grupo controlo ($p < 0,001$). Com o envelhecimento (às 20 semanas), esses valores sofreram um agravamento. Apenas as pressões arteriais sistólica e diastólica não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Às 20 semanas de idade, os ratos ZDF (fa/fa) apresentaram hipertrofia renal, relativamente aos do grupo ZDF (+/+). Histologicamente, às 8 semanas verificou-se ausência de lesões renais evidentes no grupo de controlo, mas alguns animais do grupo de diabéticos obesos (fa/fa) apresentaram já lesões discretas. Com o envelhecimento (às 20 semanas de idade) quer no grupo controlo quer nos animais diabéticos, verificaram-se lesões de espessamento das membranas basais glomerulares, de fibrose intersticial focal e de cilindúria, embora tais lesões fossem mais evidentes nos animais diabéticos. Nos ratos ZDF (fa/fa) com 20 semanas foi evidente a agressão oxidativa e o aumento de ureia plasmática. No estado de hiperinsulinemia, os ratos ZDF (fa/fa) ainda não exibem alterações histológicas características da nefropatia diabética. No entanto, os valores aumentados de MDA e de ureia sérica poderão ser indicadores de que a função renal já se encontra alterada.

[Metabolic evolution and histopathological renal changes in Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats: an experimental model of type 2 diabetes]

Diabetic nephropathy has been held liable for the increased incidence of chronic renal failure registered in recent decades. The knowledge and understanding of nephropathy associated with the phenomena of dysglycemia have been hampered by a lack of animal models that closely mimics the metabolic abnormalities. The Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF (fa/fa)) is an excellent animal model of Type 2 Diabetes presenting a physiological and metabolic profile similar to that seen in humans. They also show progressive diabetic nephropathy.

This work intended to evaluate and characterize the evolution of metabolic disorders and the kidney morphology in rats Zucker Diabetic Fatty (ZDF) with insulin resistance. Studies were carried out in ZDF (fa/fa) and control ZDF (+/+) between 8 and 20 weeks-old. Body weight, systolic and diastolic blood pressures were monitored weekly. Eight animal in each group were sacrificed randomly at 8 (S8) and 20 (S20) weeks. In the blood, serum and plasma collected the following quantifications were made: glucose, HbA1c, insulin, total cholesterol, triglycerides, urea, and creatinine. Markers of oxidative stress were also evaluated: lipidic peroxidation (MDA), uric acid and 3-nitrotirosine. The Kidney, removed immediately after sacrifice, were weighed and subjected to routine histological techniques, using hematoxylin and eosin staining and periodic acid schiff (PAS). The remaining portions of the kidney were homogenized and the lipidic peroxidation was evaluated. At 8 weeks-old all the parameters assessed in ZDF (fa/fa) rats were already higher than those of the control group ($p < 0001$). With aging (at 20 weeks-old) all the evaluated parameters were significantly aggravated. Only the systolic and diastolic blood pressures showed no statistically significant differences between groups. At 20 weeks-old, the ZDF (fa/fa) rats presented renal hypertrophy, when compared with the ZDF (+/+) group. Renal histology, showed at 8 weeks-old absence of renal lesions in the control group. Nevertheless, in some animals of the ZDF (fa/fa) group slight renal injuries were already present. With aging (at 20 weeks-old), thickening of the glomerular basement membranes, interstitial focal fibrosis and casts were present in both groups, although the injuries were most evident in diabetic animals. In the ZDF (fa/fa) rats the oxidative aggression in the kidney was evident as well as the increased plasma urea. In the phase of hyperinsulinemia, the ZDF rats (fa/fa) still do not show characteristic histological changes of diabetic nephropathy, however the values of renal MDA and urea serum may be indicators of the renal function may be impaired.

Um estudo do conteúdo de ADN por citometria de imagem no histiocitoma cutâneo canino

Pires, I.¹, Alves, A.¹, Palmeira, C.^{2,3}, Silva, F.¹, Lopes, C.⁴

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 Serviço de Imunologia-Instituto Português de Oncologia, Porto

3 Grupo de Patologia (FCS, Universidade Fernando Pessoa

4 Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

O histiocitoma cutâneo canino (HCC) é uma neoplasia epidermotrópica das células de Langerhans, muito frequente em cães jovens. Apesar de ser bastante proliferativo, o histiocitoma apresenta características citológicas benignas, não metastiza e regride espontaneamente. Por isso, com o objectivo de compreender o comportamento biológico das células do histiocitoma cutâneo canino, foi efectuado o estudo do seu conteúdo de ADN por citometria de imagem, em 20 tumores com escassa infiltração linfóide.

A avaliação do conteúdo de ADN foi efectuada em material incluído em parafina. As preparações histológicas foram coradas pelo método de Feulgen, utilizando o kit de coloração "Feulgen DNA stain" (Becton Dickinson®, Cell Analysis Systems, Elmhurst, III). A quantificação do conteúdo de ADN nuclear nas células tumorais e interpretação dos resultados foi efectuada no citómetro de imagem CAS 200 ® (Cell Analysis Systems®, Inc., Elmhurst, III). A partir da análise do histograma de ADN, foi avaliada a ploidia de ADN e a percentagem de células com conteúdo de ADN superior a 2,5c, 5c e 9c.

Todos os tumores analisados foram classificados como diplóides de ADN. Não foram identificadas células com conteúdo de ADN superior a 5c ou 9c, ou seja células verdadeiramente aneuplóides, em nenhum dos casos estudados.

As variações no conteúdo de ADN podem traduzir alterações cromossómicas e representar a instabilidade genética das neoplasias, podendo constituir um evento precoce na carcinogénese. No nosso estudo, todas as lesões foram classificadas como diplóides de ADN, não se tendo observado células com conteúdo de ADN aberrante. Não existem estudos efectuados no HCC que nos permitam comparar os resultados. Porém, o nosso trabalho está de acordo com alguns estudos efectuados em histiocitoses de células de Langerhans do homem que apresentaram histogramas diplóides, independentemente da evolução clínica.

Apesar de bastante proliferativo, o padrão de conteúdo de ADN diplóide reforça as características clínico-patológicas benignas do histiocitoma cutâneo canino.

[DNA image cytometry study in Canine Cutaneous Histiocytoma]

Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic tumour of Langerhans cells which is very frequent in young dogs. Although rapid growth and high mitotic index suggest malignancy, CCH is a benign tumour in various aspects: it does not metastasise and the spontaneous regression is the natural course of this process

In order to understand the biological behaviour of the lesion, the authors present a cytometric study in 20 spontaneous canine cutaneous histiocytoma with scarce lymphoid infiltration.

Nuclear DNA content was measured using a CAS 200 DNA® cytometer (Cell Analysis Systems®, Inc., Elmhurst, III). Samples were stained Feulgen method using a comercial Kit "Feulgen DNA Stain" (Becton Dickinson ®, Cell Analysis Systems, Elmhurst, III). DNA histograms were analysed and the following parameters studied: DNA Ploidy, DNA Index and cell populations exceeding 2,5c (DNA>2,5c); 5c (DNA>5c) and 9c value (DNA>9c).

All tumours were classified as diploid. In the cases analysed we did find cells exceeding 2,5c (DNA>2,5c); 5c (DNA>5c) and 9c value (DNA>9c).

Variations in DNA content can represent chromosomal changes and genetic instability of tumours. In our study, all lesions were classified as diploid. There are no studies on canine cutaneous histiocytoma that allow us to compare the results. However, our work is in agreement with some studies in human Langerhans cell histiocytosis that present diploid histograms.

Canine cutaneous histiocytoma presented a DNA diploid content according with its benign histological features and a low aggressive biological behaviour.

***Giardia* spp.: determinação da frequência de infecção em cães e gatos do distrito de Évora**

Baltasar, P., Vila-Viçosa, M., Padre, L., Lima, S., Vilhena, M.

Universidade de Évora; Instituto de Higiene e Medicina Tropical

A *Giardia* é um parasita ubiqüitário; é um protozoário capaz de infectar a maior parte das espécies de vertebrados, incluindo os animais domésticos e o Homem, sendo o parasita entérico mais comum em países em desenvolvimento. Existem, no entanto, algumas dúvidas em relação à sua taxonomia e potencial zoonótico.

Embora a sua presença nem sempre seja acompanhada de sinais clínicos (sobretudo nos animais domésticos), o seu potencial zoonótico faz com que seja um problema de saúde pública particularmente preocupante nas populações imunodeprimidas.

Este estudo pretende determinar a frequência de infecção por *Giardia* spp. em canídeos e felídeos do Distrito de Évora, uma vez que há pouco conhecimento em relação à sua epidemiologia em Portugal.

Foram recolhidas amostras fecais de 134 canídeos e 18 felídeos pertencentes ao Distrito de Évora, durante o período compreendido entre Novembro de 2007 e Julho de 2008. Para o efeito, foi pedida colaboração a 3 hospitais veterinários e 2 canis / gatis.

No total da amostra, 84 canídeos e 16 felídeos eram propriedade de clientes de hospitais veterinários e 50 canídeos e 2 felídeos eram oriundos dos canis / gatis.

As recolhas foram efectuadas durante 3 dias seguidos e, posteriormente, analisadas nas instalações do Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro – Universidade de Évora.

O método utilizado para a identificação de *Giardia* foi o de Faust Modificado e foram considerados positivos os animais que apresentaram pelo menos uma das sub-amostras positiva.

Durante as recolhas não houve factores de exclusão.

Das 134 amostras de cães analisadas obtiveram-se 34 resultados positivos (25,37%) e, nos gatos, encontraram-se 2 animais positivos em 18 (11,11%). Não se detectou *Giardia* em nenhum dos felídeos pertencentes a clientes dos hospitais veterinários, mas os dois felídeos do gatil apresentaram resultados positivos. No que diz respeito aos canídeos, 30 das amostras fornecidas pelos canis foram positivas (60,00%), o que só aconteceu com 4 das amostras fornecidas pelos hospitais veterinários (4,76%).

[*Giardia* spp.: determination of the frequency of infection in dogs and cats from the district of Évora]

Giardia is an ubiquitous parasite; it is a protozoan able to infect most of the species of vertebrates, including domestic animals and humans, being the most common enteric parasite in developing countries. However, there are still many doubts regarding its taxonomy and zoonotic potential.

Although its presence does not necessarily mean that clinical signs will develop (mostly true for domestic animals), its zoonotic potential makes it a public health issue particularly important for immunocompromised populations.

Since very little is known about its epidemiology in Portugal, this study seeks to determine the frequency of infection of *Giardia* spp in cats and dogs from the District of Évora.

During the course of this study, stool samples were collected from 134 dogs and 18 cats. From November of 2007 to July 2008, these samples were provided by 3 veterinary hospitals and 2 shelters.

In total, 84 dogs and 16 cats belonged to clients of the veterinary hospitals, while 50 dogs and 2 cats were shelter animals.

The stool samples were collected during 3 consecutive days and tested in the Parasitology Laboratory Victor Caeiro – University of Évora.

The method used to detect the presence of *Giardia* was the Modified Faust and were considered positives the animals that had at least 1 sub-sample positive.

There were no exclusion factors during the sample collection.

Of the 152 samples tested, 34 of 134 dogs (25.37%) and 2 of 18 cats (11.11%) tested positive for *Giardia* spp. The parasite was not detected in any of the cats belonging to clients of the veterinary hospitals but both shelter cats showed positive results. As for dogs, 30 shelter animals were infected (60.00%), compared to 4 from the veterinary hospitals (4.76%).

Infeções parasitárias com carácter zoonótico em cães e gatos errantes do Concelho de Coimbra

Sousa, S.¹, Rosa, C.¹, Mateus, F.¹, Portugal, M.², Antunes, N.¹, Madeira de Carvalho, L.M.²

1 Escola Universitária Vasco da Gama, Estrada da Conraria. 3040-714 Castelo Viegas – Coimbra; ramalhosousa@gmail.com

2 Canil Municipal de Coimbra, Campo do Bolão, Mata do Choupal 3000 Coimbra

3 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt .

Considerando a importância zoonótica das infeções parasitárias de cães e gatos errantes, procedeu-se à análise de amostras biológicas colhidas no Canil/Gatil Municipal de Coimbra com o objectivo de avaliar a presença e identificar ectoparasitas, parasitas gastrointestinais e *Dirofilaria immitis*.

Nos meses de Fevereiro e Março de 2008 foram recolhidas 40 amostras em cães e 10 amostras em gatos no Canil Municipal de Coimbra. Para a pesquisa de ectoparasitas foram efectuadas raspagens de pele e colhidas amostras de cerúmen, para a pesquisa de parasitas gastrointestinais foram colhidas fezes e para a pesquisa de *Dirofilaria immitis* foi colhido sangue com EDTA. As fezes foram analisadas segundo a técnica de centrifugação referida por Conboy (1997) e as microfilárias de *Dirofilaria immitis* foram observadas pelo método de Knott.

No que respeita à pesquisa de ectoparasitas, em apenas um gato foi observada uma infecção mista de ixodídeos do género *Ixodes* e pulgas da espécie *Ctenocephalides canis*. No total de 40 cães, foram observados ectoparasitas em 18 sendo que 13 apresentaram infeções simples com *Ctenocephalides canis* (2), *Ctenocephalides felis* (3) e *Rhipicephalus sanguineus* (8) e 5 infeções mistas com *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis* (2), *Ctenocephalides canis* e *Pulex irritans* (1), *Ctenocephalides felis* e *Rhipicephalus sanguineus* (1), *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* (1).

Em 30 das 40 amostras de fezes de canídeos, foram observados parasitas gastrointestinais como Ancilostomídeos (13), *Dipylidium caninum* (7), *Toxocara canis* (5), *Trichuris vulpis* (5), *Isospora canis* (5) e *Taenia* spp. (1).

Em todas as amostras de fezes de gato foram diagnosticados parasitas gastrointestinais tendo sido observados ovos de *Toxocara cati* (6), larvas L1 de *Aerulostrongylus abstrusus* (5), *Isospora felis* (5) e ovos de ancilostomídeos (1).

Quanto às microfilárias de *Dirofilaria immitis*, foram identificadas em 8 amostras de sangue dos 40 cães observados. Todas as amostras de sangue de gato revelaram-se negativas ao método de Knott.

[Zoonotic parasitic infections in street dogs and cats from Coimbra Council]

Considering the importance of zoonotic parasitic infections in dogs and cats, the aim of our study was to test biological samples, collected from dogs and cats captured in the street by Coimbra Council Veterinary Authority, in order to identify ectoparasites, intestinal parasites and *Dirofilaria immitis*.

During February and March 2008, biological samples were collected from 40 dogs and 10 cats captured in Coimbra Council by Veterinary Authority. Biological samples included skin scrapings and debris from the ear channel for ectoparasites observation and identification, faeces for intestinal parasites identification following centrifugation method described by Conboy (1997) and EDTA blood samples for the identification of *Dirofilaria immitis* microfilariae according to Knott method.

Considering ectoparasites identification, only one cat showed a mixed ectoparasite infection, with the presence of ticks belonging to *Ixodes* genus and fleas identified as *Ctenocephalides canis*.

In all of 40 tested dogs, 18 were positive but 13 animals showed a unique infection by *Ctenocephalides canis* (2), *Ctenocephalides felis* (3) e *Rhipicephalus sanguineus* (8) and 5 animals had a mixed infection caused by *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis* (2), *Ctenocephalides canis* e *Pulex irritans* (1), *Ctenocephalides felis* e *Rhipicephalus sanguineus* (1), *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* (1).

Referring to coprological assay, 30 of 40 tested faecal samples were positive with the presence of *Ancylostomatidae* (13), *Dipylidium caninum* (7), *Toxocara canis* (5), *Trichuris vulpis* (5), *Isospora canis* (5) and *Taenia* spp. (1). All cat faecal samples were positive to coprological assay with the presence of *Toxocara cati* (6), L1 larvae of *Aerulostrongylus abstrusus* (5), *Isospora felis* (5) e *Ancylostomatidae* eggs (1).

Concerning the identification of microfilaridae from *Dirofilaria immitis*, 8 blood samples of the 40 examined dogs were positive and all cat blood samples were negative for Knott technique.

Dirofilariose canina no distrito de Coimbra

Sousa, S.¹, Pimentel, M.¹, Silva, A.¹, Madeira de Carvalho, L.²

¹ Escola Universitária Vasco da Gama, Estrada da Conraria, 3040-714 Castelo Viegas – Coimbra; ramalhosousa@gmail.com

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt .

Este estudo teve como objectivo identificar os concelhos do distrito de Coimbra com maior número de casos de dirofilariose canina em 2006, assim como caracterizar os animais mais afectados e determinar a prevalência por *Dirofilaria immitis* nos canídeos do concelho de Coimbra, em 2007.

A recolha de informação para o estudo retrospectivo foi efectuada por entrevista pessoal, durante o período de 19 de Fevereiro de 2007 e 9 de Março de 2007, aos proprietários de 100 animais e aos médicos veterinários municipais e clínicos em 13 concelhos do distrito de Coimbra (Arganil, Coimbra, Cantanhede, Condeixa-a-Nova, Figueira da Foz, Lousã, Mira, Miranda do Corvo, Montemor-o-Velho, Oliveira do Hospital, Penela, Soure e Vila Nova de Poiares), sobre casos de Dirofilariose diagnosticados em 2006.

Neste mesmo período foram colhidas duas amostras de sangue, com e sem anti-coagulante (EDTA), por punção das veias cefálica ou safena, a 100 cães do concelho de Coimbra, com idades superiores a 6 meses, com a colaboração do Canil Municipal de Coimbra e Clínicas Veterinárias localizadas em Coimbra.

As amostras de sangue de cada animal foram analisadas pelas técnicas gota espessa, micro-hematócrito, Knott modificado e teste de imunocromatografia directa Speed DIRO® para pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis*.

A análise da informação obtida por entrevista revelou que, durante o ano de 2006, foram diagnosticados 1050 casos de dirofilariose canina nos vários concelhos do distrito de Coimbra, sendo os meios de diagnóstico mais utilizados a gota espessa e pesquisa de antígenos por imunocromatografia directa. Os concelhos próximos ao estuário do rio Mondego registaram o maior número de casos de dirofilariose nomeadamente Montemor-o-Velho com 600 casos, Coimbra com 224 e Figueira da Foz com 150.

Observou-se maior prevalência em animais do sexo masculino (22,7%) com idade superior a 8 anos (28,6%), de pêlo médio (27,8%), de porte médio (23,5%), com aptidão para caça (66,7%), de meios rurais (23,9%) e que dormem no exterior (20,6%).

No concelho de Coimbra foi observada uma prevalência de 13%, confirmada por todos os métodos de diagnóstico utilizados.

[Canine Dirofilariosis in Coimbra district]

The aim of this study was to identify counties in Coimbra district with the highest number of canine Dirofilariosis cases, in 2006, to characterize the most affected animals and also to evaluate the prevalence of *Dirofilaria immitis* in Coimbra County, in 2007.

During the period from February 19 and March 9, 2007, the collection of information for retrospective study was made by a personal interview, to dog owners and veterinary clinicians, from 13 counties in Coimbra district (Arganil, Coimbra, Cantanhede, Condeixa-a-Nova, Figueira da Foz, Lousã, Mira, Miranda do Corvo, Montemor-o-Velho, Oliveira do Hospital, Penela, Soure e Vila Nova de Poiares), about canine Dirofilariosis cases diagnosed in 2006.

In the same period, in 100 animals from Coimbra County, two blood samples were collected from each animal, with and without anti-coagulant (EDTA), with the collaboration of Local Veterinary Authority and veterinary clinicians from Coimbra Council.

Blood samples were tested by thick drop technique, micro-hematocrit, Knott modified method and direct test of immunochromatography Speed DIRO® to detect the presence of *Dirofilaria immitis* antigens.

According to information collected from interviews, in 2006, veterinary clinicians diagnosed 1050 cases of canine dirofilariosis in Coimbra District. Diagnostic methods mostly used were thick drop techniques and direct test of immunochromatography. The highest number of cases was found in Counties around Mondego river, in Montemor-o-Velho County 600 cases, in Coimbra County 224 cases and in Figueira da Foz County 150 cases. An highest prevalence was also found in males (22.7%), older than 8 years (28.6%), animals of medium size (23.5%), hunting breeds (66.7%), from rural areas (23.9%) and sleeping outdoor (20.6%).

Results of infection rate with *Dirofilaria immitis* in Coimbra Council in 2007, showed that 13% of tested samples were positive to all diagnostic methods.

Leishmaniose canina no distrito de Coimbra

Sousa, S.¹, Blanco, A.S.¹, Teixeira, L.¹, Madeira de Carvalho, L.²

¹ Escola Universitária Vasco da Gama, Estrada da Conraria, 3040-714 Castelo Viegas – Coimbra; ramalhosousa@gmail.com

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt

Sabendo que a Leishmaniose é uma zoonose frequente no Distrito de Coimbra, os objectivos do nosso trabalho foram realizar um estudo retrospectivo aos casos de leishmaniose canina diagnosticados no Distrito de Coimbra, em 2006, e também determinar a prevalência por *Leishmania* em cães dos Concelhos de Coimbra e Arganil, entre Fevereiro e Março de 2007.

A recolha de informação para o estudo retrospectivo foi efectuada por entrevista pessoal, a 20 médicos veterinários clínicos, de 12 Concelhos do Distrito de Coimbra (Cantanhede, Coimbra, Condeixa-a-Nova, Figueira da Foz, Lousã, Mira, Miranda do Corvo, Montemor-o-Velho, Oliveira do Hospital, Penacova, Penela e Soure), sobre casos de Leishmaniose canina diagnosticados em 2006. Para determinar a prevalência por *Leishmania* foram colhidas, no Concelho de Coimbra, 100 amostras de sangue e 72 amostras de medula óssea, e, no Concelho de Arganil, 23 amostras de sangue. O diagnóstico foi efectuado pela pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por Imunofluorescência Indirecta (Fluoleish®) e pela observação microscópica de citologias coradas pelo método de Giemsa.

A análise da informação obtida por entrevista revelou que, em 2006, 843 casos leishmaniose canina foram diagnosticados. A maioria dos casos foi diagnosticada durante a Primavera e Verão, em animais com sinais clínicos de leishmaniose, com idades desde 6 meses e 14 anos e de diversas raças. Os sinais clínicos mais observados foram os sinais dermatológicos incluindo seborreia, dermatite e alopecia, e ainda caquexia, epistaxis, sinais gastrointestinais, PD/PU e onicogribose. O diagnóstico foi efectuado, na maioria dos casos, recorrendo à pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indirecta ou Imunocromatografia. Todos os respondentes referiram usar o mesmo protocolo de tratamento que inclui o uso de antimoniato de meglumina e alopurinol, apresentando elevadas taxas de recidiva (cerca de 100%).

Cerca de 80% dos respondentes, referiu alertar os proprietários de cães para medidas profiláticas como o uso de substâncias repelentes como deltametrina (Scalibor®), imidacloprid + permetrina (ADVANTIX®) e permetrina (Pulvex®).

No que respeita à determinação da prevalência em cães do Concelho de Coimbra, verificou-se que 10,1% dos animais apresentou anticorpos com títulos superiores a 80 e em 12,5% das amostras de medula óssea foram observadas formas amastigotas de *Leishmania*. No Concelho de Arganil, apenas 4,3% das amostras testadas apresentou anticorpos, com título de anticorpos superior a 160 e correspondendo a um animal com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose.

[Canine leishmaniosis in Coimbra district]

Knowing that leishmaniosis is a frequent zoonosis in Coimbra District, the purposes of our work were to make a retrospective study in canine Leishmaniosis cases diagnosed in Coimbra district, in 2006; and also to calculate the *Leishmania* prevalence in dogs from Coimbra and Arganil Counties, between February and March 2007.

The collection of information for retrospective study was made by a personal interview, to 20 veterinary clinicians, from 12 councils in Coimbra district (Cantanhede, Coimbra, Condeixa-a-Nova, Figueira da Foz, Lousã, Mira, Miranda do Corvo, Montemor-o-Velho, Oliveira do Hospital, Penacova, Penela e Soure), concerning canine Leishmaniosis cases diagnosed in 2006.

To calculate the *Leishmania* prevalence in dogs, we obtained 100 blood samples and 72 bone marrow samples in Coimbra Council and 23 blood samples in Arganil Council. Diagnosis of Leishmaniosis comprised the search of antibodies anti-*Leishmania* by Indirect Immunofluorescence (Fluoleish®) and microscopic observation of cytologies stained by Giemsa.

Information obtained from respondents revealed that, in 2006, 843 cases of canine leishmaniosis were diagnosed. Most cases were diagnosed during Spring and Summer, in animals with clinical signs of leishmaniosis, aged from 6 months to 14 years and of several breeds. The most observed signs were dermatological, including seborrhea, dermatitis and alopecia; emaciation, epistaxis, gastrointestinal signs, PD/PU and onicogriphosis. Serological methods were mostly used in diagnosis procedure with search of anti-*Leishmania* antibodies by Indirect Immunofluorescence and Immunochromatography.

All respondents used a pharmacological treatment protocol which included meglumin antimoniate and alopurinol, however showing high levels of relapsing (almost 100%).

About 80% of respondents advise owners about preventive measures with repellent substances such as deltamethrin (Scalibor®), imidacloprid + permethrin (ADVANTIX®) and permethrin (Pulvex®).

Concerning the calculation of prevalence in dogs from Coimbra council, 10.1% of animals presented antibody titres above 80 and in 12.5% of tested bone marrow, amastigotes forms of *Leishmania* were observed. In Arganil Council, only 4.3% of tested samples presented antibodies with titres above 160 belonging to an animal with clinical signs of leishmaniosis.

Expressão de citocinas em tecidos de cães infectados com *Leishmania infantum* /chagasi e em cães tratados

Alexandre-Pires, G.¹, Barbosa, M.A.G.², Soares-Clemente, M.³, Marques, C.³, Rodrigues, O.R.³, Villa de Brito, T.¹, Pereira da Fonseca, I.¹, Alves, L.C.², Santos-Gomes, G.M.³

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil

3 Instituto de Higiene e Medicina Tropical, UNL, Lisboa

Objectivos: A leishmaniose canina é um problema de Saúde Pública em áreas endémicas, nas quais o cão é o maior reservatório de leishmaniose visceral. O objectivo deste estudo foi avaliar e comparar os níveis de expressão de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-12) na medula óssea, linfonodo e sangue periférico, em 59 cães provenientes de Portugal e do Brasil.

Métodos: O estudo foi realizado em quatro grupos constituídos da seguinte forma: animais sintomáticos (n=24), assintomáticos (n=13) tratados (n=11) e saudáveis [grupo controlo, (n=11)]. A expressão de IL-2, IL-4, IL-12 e IFN- γ na medula óssea, no linfonodo e no sangue periférico foi avaliada através de PCR em tempo real (RT-PCR).

Resultados e conclusões: Sangue periférico – Nos cães assintomáticos observaram-se elevados níveis de IL-2 e IL-4. Nos cães sintomáticos observou-se um aumento da expressão de IL-12, IFN- γ IL-2 e IL-4 quando comparados com os cães saudáveis e com os animais assintomáticos.

Nos cães que foram submetidos a tratamento para a leishmaniose verificaram-se níveis reduzidos de citocinas.

Linfonodo – A expressão do mRNA de IL-2 e IL-12 estava significativamente aumentada nos linfonodos dos cães assintomáticos. Os cães sintomáticos demonstraram elevados níveis de IL-2 e nos cães tratados observou-se um aumento da expressão de IL-4.

Medula óssea – Os níveis de expressão de IL-2 surgiram mais altas nas amostras de medula óssea dos cães assintomáticos enquanto a expressão de IL-4 apresentou-se mais elevada nos cães sintomáticos. Por outro lado, os níveis de expressão do mRNA do IFN- γ estavam reduzidos no grupo dos animais infectados e no grupo dos animais tratados.

Respostas imunitárias diferentes foram observadas nos diferentes tecidos quando o parasita persiste. O sangue periférico dos animais sintomáticos exibiu uma resposta imunitária mista, Th1/Th2, e uma elevada expressão de IFN- γ o que aponta para uma forte reacção inflamatória contra o parasita. As amostras obtidas do linfonodo e da medula dos animais sintomáticos revelaram uma predominante resposta imunitária Th1 acompanhada por níveis elevados de IL-12, o que sugere o controlo da replicação do parasita. Apesar dos animais demonstrarem capacidade de controlar o parasita, a expressão do IFN- γ apresentou-se baixa quer nos cães tratados quer nos cães assintomáticos, sugerindo que a eventual presença de alguns amastigotas iniba a libertação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ , aumentando assim a possibilidade da sobrevivência do parasita.

[Cytokine expression in tissues of dogs infected with *Leishmania infantum* /chagasi and after treatment]

Objectives: Canine leishmaniasis represents a public health problem in endemic areas being the dog the main reservoir for visceral leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate and compare the levels of cytokine expressions (IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-12) in bone marrow, lymph node and blood of 59 dogs from Portugal and Brazil.

Methodology: The study was performed in four groups as follows: symptomatic (n=24), asymptomatic (n=13) treated (n=11) and healthy dogs (n=11). The expression of IL-2, IL-4, IL-12 and IFN- γ in bone marrow, lymph node and blood was studied using a quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results and Conclusions: Peripheral blood - asymptomatic dogs revealed high levels of IL-2 and IL-4. Symptomatic animals showed increased expression of IL-12, IFN- γ , IL-2 and IL-4 when compared with healthy dogs and with asymptomatic animals.

Reduced levels of cytokines were observed in the dogs that had been subject to treatment against canine leishmaniasis.

Lymph node - Expression of IL-12 and IL-2 mRNA was significantly increased in lymph nodes of asymptomatic dogs. Symptomatic dogs revealed high levels of IL-2 and treated dogs showed an increased of IL-4 expression.

Bone marrow - IL-2 expression levels were higher in bone marrow samples of asymptomatic dogs and IL-4 showed higher expression in symptomatic dogs. On other hand the level of expression of IFN- γ mRNA was reduced in infected and treated animals.

Different immune responses were observed in different tissues where the parasite persists. Peripheral blood of symptomatic dogs exhibited a mixed Th1/Th2 immune response with high expression of IFN- γ pointing for the existence of a strong inflammatory reaction against the parasite. Lymph nodes and bone marrow of asymptomatic animals revealed the predomination of a Th1 immune response in presence of high levels of IL-12 suggesting control of parasite replication. Although the animals seems to be able to control the parasite, the expression of IFN- γ in both asymptomatic and treated dogs were low, suggesting that the possible presence of some amastigotes inhibits the release of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ increasing the chance of parasite survival.

Oncocercose ocular num cão em Portugal

Faísca, P.¹, Gomes, J.^{1,2}, Botelho, M.³

1 Faculdade de Medicina Veterinária, ULHT

2 INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

3 Clínica veterinária Olha O Bicho

História clínica: Em Agosto de 2008, um cão vadio de raça indeterminada com 3 anos de idade proveniente do Algarve, foi observado devido a problemas oculares. O cão apresentava uma queratite supurativa com edema severo da córnea, blefarodema e uma fistula purulenta na pálpebra superior. Nessa altura foi feita pesquisa serológica de *Dirofilaria immitis* por ELISA com resultado negativo. Foi iniciado de imediato tratamento conservativo com antibiótico e anti-inflamatório durante uma semana sem sucesso. Devido à persistência da fistula purulenta na pálpebra superior, realizou-se um exame ecográfico que revelou uma massa de 0,5 cm na região retrobulbar. Optou-se em consequência pela enucleação e análise histopatológica do olho.

Histopatologia: A peça foi fixada em formol tamponado a 10% e foram preparadas lâminas com hematoxilina-eosina.

O exame histopatológico da massa revelou uma reacção granulomatosa adjacente à esclera com vários cortes transversais de um nematode fêmea gestante. O exsudado inflamatório era rico em macrófagos e neutrófilos secundados por plasmócitos. A rodear o corpo do parasita observaram-se vários microabscessos.

O parasita apresentava um diâmetro de 191 a 267 μm (média= 225 μm), era delimitado por uma cutícula externa e continha um intestino de pequenas dimensões. Em alguns dos cortes transversais foi possível visualizar o útero do parasita cheio de microfilárias.

A cutícula consistia em duas camadas. A mais externa continha cristas arredondadas com 3 a 5 μm de altura e espaçadas entre si cerca de 22 μm de forma regular. A camada interna continha estriações, uma subjacente a cada crista e um entre cristas vizinhas.

A cutícula tinha uma espessura de 6 μm entre cristas e cerca de 11 μm nas cristas. As cordas laterais eram bem evidentes e continham um núcleo ovóide com 9x7 μm . Na esclera adjacente foram observados inúmeras microfilárias de tamanho reduzido (70x5 μm).

Conclusões: As características morfológicas do parasita permitiram identificá-la como uma fêmea gestante da espécie *Onchocerca*.

Do nosso conhecimento este é o primeiro caso documentado de Oncocercose Ocular em cães em Portugal. Os autores recomendam por isso que se adicione a Oncocercose como diagnóstico diferencial em casos de nódulos oculares ou peri-oculares em Portugal, especialmente em animais provenientes das regiões mais a sul do país.

[Canine ocular onchocercosis in Portugal]

Clinical History: In August 2008, a 3-year-old male mongrel stray dog from Algarve (South Portugal) was attended at the local veterinarian with a history of eye disease. The dog was presented with severe corneal edema, suppurative keratitis, blepharodema and a draining fistula in the upper eyelid. A serologic test kit, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for *Dirofilaria immitis* was negative. A conservative treatment with antibiotics and anti-inflammatory drugs was given for one week without clinical improvement. An ecographic examination was performed and revealed a mass with 0,5 cm in the retrobulbar space. The dog went to surgery for an enucleation procedure due to the poor eye condition.

Histopathology: The eye was removed and fixed in 10% phosphate buffered formalin, and haematoxylin and eosin stained sections were prepared.

Histopathological examination of the mass revealed a granuloma type reaction with several sections of a coiled gravid female nematode in the retrobulbar space. The inflammatory exudate was rich in macrophages and neutrophils followed by plasmocytes. Several microabscesses surrounded the body of the nematode.

The parasite was 191 to 267 μm in diameter (mean= 225 μm), surrounded by a cuticle and owing an intestine. In some transverse sections of the parasite the uterus was seen and was filled with small unsheathed microfilariae. The cuticle consisted of two separated layers in longitudinal sections. The external layer had cuticular ridges (annulations) that appeared as cuticular bumps in longitudinal sections. The ridges were round in shape, 3-5 μm tall, evenly spaced and distanced 22 μm from each others. The internal layer below the ridges contained striations, on average one striation under every ridge and one between neighbouring ridges. The cuticle was about 6 μm thick between ridges and 11 μm at ridges. The lateral chords were marked, and the nuclei of the chord were ovoid, measuring 9x7 μm . Numerous exceptionally small (70x5 μm) microfilariae were also seen in the surrounding sclera.

Conclusions: Based on the morphological features, the worm was identified as a gravid female specimen of *Onchocerca* species.

Of our knowledge this case is the first documented ocular *Onchocerca* infection in dogs in Portugal. Thus, Onchocercosis should be considered in the differential diagnosis of ocular and periocular nodules in dogs in Portugal, especially in the southern regions of the country.

Avaliação de um ensaio de PCR para diagnóstico de Herpesvírus Felino em animais com lesões oftalmológicas

Duarte, A., Alberto, A., Delgado, E., Sales Luis, J. e Tavares, L.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Nos felídeos a maioria das conjuntivites são infecções primárias causadas particularmente pelo Herpes Virus Felino (HVF) e a *Chlamydia*. A realização de um diagnóstico etiológico é importante para o estabelecimento do melhor regime terapêutico. Para determinar a etiologia da conjuntivite crónica em gatos e avaliar a sua posterior utilização como meio de diagnóstico, utilizou-se a técnica de PCR para detectar o HVF e a *Chlamydia*.

Os pacientes felinos incluídos no estudo apresentaram-se à consulta de Oftalmologia no Hospital Escolar da FMV/UTL entre 2003 e 2008 com história de conjuntivite crónica uni ou bilateral, acompanhada ou não por ulceração da córnea, e ausência de sinais respiratórios.

No exame oftálmico apresentavam blefarospasmo, hiperémia conjuntival, quemose, epífora e corrimento ocular seroso ou mucopurulento. Alguns dos animais exibiam sinais de queratite, com neovascularização da córnea, tecido de granulação e úlceras.

Com o auxílio de zangarões colheu-se material do saco conjuntival de cada olho do animal e da orofaringe. As amostras foram conservadas a -20 °C até ao seu processamento. A detecção de DNA de HVF e de *Chlamydia* foi efectuada por PCR após extracção do DNA.

Sempre que possível uma amostra de sangue total foi colhida para determinação de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e detecção de antígeno do Vírus da Leucémia felina (FeLV). A todos os animais positivos a FIV foi efectuada a extracção de DNA genómico a partir do sangue total e uma região genómica do FIV incluída no gene gag foi amplificada e submetida a um ensaio de RFLP para subtipificação viral.

A amostragem incluiu sessenta animais dos quais 38% (23/60) foram positivos para HVF e 6,6% para *Chlamydia* (4/60). O rastreio para FIV e FeLV efectuado exclusivamente em 15 animais e revelou 15% de positivos para o FIV (6/15) e 6,6% (1/15) para FeLV. Os subtipos de FIV detectados incluíram o subtipo A (1/6) e o subtipo B1 (5/6) já descrito em Portugal. Cinco dos seis animais positivos a FIV estavam co-infectados com HVF e/ou *Chlamydia*.

Na maioria das infecções herpéticas primárias a recuperação é total, mas aproximadamente 80% dos gatos tornam-se portadores assintomáticos. Em 45% destes o vírus sofre uma reactivação manifestada por eliminação de vírus ou por acessos crónicos de doença clínica. A infecção concomitante com FeLV ou FIV está associada a um aumento da ocorrência de conjuntivite crónica. A utilização de um ensaio de PCR apresenta uma especificidade e sensibilidade de detecção superior à de outras técnicas disponíveis, constituindo uma boa abordagem para o diagnóstico etiológico em casos de conjuntivite e/ou queratite crónica em felídeos.

[Evaluation of a PCR assay for Feline Herpesvirus diagnostic in cats with ophthalmological lesions]

The majority of feline conjunctivitis has a primary infectious agent mainly Feline Herpes virus (FHV) and *Chlamydia*. The possibility of an etiological diagnostic is valuable information, allowing the recommendation of the best therapeutic measures. In an attempt to assess the etiology of chronic conjunctivitis in cats and evaluate its usefulness as a diagnostic tool, we tested a PCR assay to detect FHV and *Chlamydia* DNA.

The animals included in this study attended the Ophthalmology Referral Consult at the Faculty of Veterinary Medicine Hospital between 2003 and 2008. They shared a clinical history of chronic uni or bi-lateral conjunctivitis, with or without corneal ulceration and absence of respiratory signs.

In the ophthalmological exam they presented with blepharospasm, conjunctival hyperemia, chemosis, epiphora and serous or mucopurulent discharge. Some animals had signs of keratitis with corneal neo-vascularisation, granulation tissue and ulcers.

The biological materials collected included conjunctival swabs from each eye and from the orofarinx. The samples were stored at -20 °C until processing and the detection of FHV and *Chlamydia* DNA was performed by PCR after nucleic acid extraction. Whenever possible a sample of whole blood was taken for determination of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) antibodies and Feline Leukemia Virus (FeLV) antigen. The genomic DNA from all FIV positive animals was extracted from the whole blood, and a genomic region included in the gag gene was amplified and subject to RFLP for viral sub typing.

The sampling included sixty animals from which 38% (23/60) were FHV positive and 6.6% (4/60) were *Chlamydia* positive. The FIV/FeLV survey was done in fifteen animals and revealed 15% FIV positives (6/15) and 6.6% (1/15) FeLV positives. The FIV subtyping showed 1/6 Subtype A and 5/6 Subtype B1, previously described only in Portugal. Five of the six FIV positive animals were co-infected with FHV and/or *Chlamydia*.

Most of the primary FHV infections undergo complete recovery but approximately 80% of the animals became asymptomatic carriers. In 45% of these animals a virus reactivation may occur and as a consequence viral shedding and chronic episodes of clinical conjunctivitis may happen. The use of a PCR assay presents a higher specificity and sensibility than other diagnostic methods available, allowing a better knowledge of the etiology of chronic conjunctivitis and/or keratitis in feline patients.

Rastreo virológico e subtipificação de Parvovírus dos canídeos e felídeos

Veiga, I., Ramilo, D., Duarte, A., e Tavares, L.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

O Parvovirus canino do tipo 2 (CPV-2) e o Vírus da Panleucopénia felina (FPLV) estão incluídos no género Parvovirus, Família Parvoviridae. Estes vírus partilham uma alta homologia genética, sendo capazes de infectar espécies animais distintas *in vivo* e dando origem a uma doença entérica nos canídeos e a um quadro de panleucopénia nos Felídeos. Esta pode provocar alta mortalidade, particularmente em animais jovens.

Actualmente o CPV-2 é utilizado exclusivamente enquanto vírus vacinal. A diversidade genética que apresenta *in vivo* permite a sua diferenciação em três subtipos antigénicos; CPV2a, CPV2b e CPV2c, definidos por alterações amino-ácidas na proteína da capsíde a VP2. Paralelamente têm sido descritos episódios de infecção de felídeos com estas variantes, o que sugere uma adaptação do vírus a diferentes espécies.

De forma a determinar a disseminação dos 3 subtipos de CPV-2 em Portugal, foi efectuado um rastreo virológico para identificação de CPV-2 e FPLV no período compreendido entre 2006-2007 a partir de animais com um quadro clínico de parvovirose felina e também de animais necropsiados que apresentaram um exame anatómico-patológico suspeito de parvovirose felina e/ou canina.

Os materiais processados incluíram dejectos nos animais vivos e dejectos e intestino delgado nos cadáveres. Após homogeneização em PBS e clarificação, o ácido nucleico viral foi extraído e submetido a um primeiro PCR de rastreo que amplifica o extremo 3' do gene VP2. Todos os materiais positivos foram submetidos a um segundo ensaio de PCR utilizando quatro pares de primers, que permitem a amplificação da totalidade do gene em quatro fragmentos sobreponíveis. Após amplificação os fragmentos foram sequenciados directamente e a sequência amino-ácida foi traduzida. A proteína VP2 foi posteriormente alinhada com outras sequências de VP2 de Parvoviridae disponíveis na base de dados Genbank. Após identificação dos locais informativos e análise filogenética as sequências foram subtipificadas.

Este estudo incluiu material de 8 canídeos vivos e 11 mortos e 2 felídeos mortos. A subtipificação baseada na sequência amino-ácida da proteína VP2 revelou a presença de FPLV nas amostras provenientes de felídeos (2/2), a presença de CPV-2 vacinal na amostra de canídeo morto (1/19). A presença de CPV-2c foi confirmada nas restantes amostras de canídeos (18/19).

O estudo da epidemiologia molecular dos parvovirus permite aferir os subtipos circulantes na área analisada e determinar a incidência da infecção causada por variantes virais com diferentes características antigénicas e biológicas. A identificação de CPV2c na região da Grande Lisboa em Portugal permite confirmar a disseminação eficaz deste subtipo e a ausência de outros subtipos residentes, provavelmente devido a substituição.

[Virological survey and subtyping of canine and feline Parvovirus]

Canine Parvovirus Type 2 (CPV-2) and Feline Panleukopenia virus (FPLV) are included in Genera Parvovirus, Family Parvoviridae. These virus share high genetic homology and are capable of infecting different species *in vivo*, causing an enteric disease in dogs and a panleukopenia condition in cats. Both can induce high mortality, particularly in young animals. Presently CPV-2 is used mainly as a vaccine virus. Based on amino-acid variation in the viral capsid VP2 this virus can be differentiated in three antigenic subtypes; CPV2a, CPV2b and CPV2c. Episodic infection of Felidae by these viral variants has also been described, suggesting a mechanism of viral adaptation to new hosts.

In order to determine the dissemination of CPV2 subtypes in Portugal a virological survey was performed during 2006-2007 for identification of CPV-2 and FPLV in sick and dead animals, the later presenting an anatomico-pathological exam compatible with Canine or Feline parvovirose.

The biological materials included stool from sick animals and stool and small intestine from dead animals. The material were homogenized in PBS and centrifuged and the viral nucleic acid was extracted and submitted to a survey PCR assay that amplifies the 3' end of VP2 gene. All positive materials were then subjected to a second PCR assay with four primer pairs that allowed the amplification of the total sequence of VP2 gene in four amplicons. After direct sequencing of the amplicons and translation to the amino-acid sequence, the VP2 protein was aligned with previously described Parvoviridae protein sequences available at Genbank. The informative amino-acid changes were identified and submitted to phylogenetic analysis for subtyping.

This study included 8 sick dogs, 11 dead dogs and 2 dead cats. The subtyping based on the amino-acid sequence of the VP2 protein revealed the presence of FPLV in both cat samples (2/2) and the presence of CPV2 in one dead canine (1/19). In the remaining canine samples (18/19) the presence of CPV2c was confirmed.

The study of the viral molecular epidemiology allows us to infer the circulating subtypes in the analyzed area and determines the incidence of infection caused by viral variants with distinct antigenic and biological properties. The identification of CPV2c in the urban area of Lisbon confirms the dissemination of this subtype and the absence of others, most likely due to replacement.

Relações anatomotopográficas cranioencefálicas entre 5 pontos craniométricos de referencia e a fissura longitudinal dorsal cerebral para procedimentos de neurocirurgia em canídeos braquicéfalos

Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, UCH

Introdução: Conhecimento das relações anatomotopográficas cranioencefálicas, permite relacionar a superfície externa da calote craniana com as regiões encefálicas que se localizam internamente, possibilitando delimitar mais facilmente os acessos neurocirúrgicos a realizar. A escolha de alguns pontos craniométricos referenciais principais (PCRP) ou secundários (PCRS) de localização uniforme permitirá funcionar como um sistema de GPS ao acesso a estruturas encefálicas úteis (EEU) em diferentes técnicas neurocirúrgicas. **Objectivos:** Este trabalho objectivou avaliar as relações entre 5 PCRP e a Fissura Longitudinal Dorsal Cerebral (FLDC) num cenário de neuronavegação. **Materiais e métodos:** Utilizando uma amostra de 69 (N=69) cadáveres de canídeos braquicéfalos, realizou-se a exposição da superfície craniana externa com uma incisão biauricular, rebatimento dos temporais e exposição das suturas cranianas. Identificaram-se os 5 PCRP seleccionados: Astério, Bregma, Estefânio, Glabela e Pterio, onde se realizaram orifícios de 1,5 mm de diâmetro por onde se introduziram perpendicularmente à superfície craniana externa, cateteres periféricos; os quais foram posteriormente cortados. Realizou-se a abertura circunferencial necroscópica do crânio e da Dura-máter seguida da remoção cuidadosa do encéfalo como um bloco único e da medição entre os locais de introdução dos cateteres a partir da calote craniana e a EEU em neurocirurgia: Fissura Longitudinal Dorsal Cerebral (FLDC). A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS).

Resultados: O PCRP Astério direito e esquerdo, dista ao início e fim da FLDC $62,08 \pm 10,56$ mm e de $60,81 \pm 10,34$ mm (dto e esq), e $50,62 \pm 8,59$ mm e de $54,05 \pm 9,18$ mm (dto e esq) respectivamente.

O PCRP Bregma, dista ao início e fim da FLDC $35,31 \pm 5,95$ mm, e $17,62 \pm 2,96$ mm respectivamente

O PCRP Estefânio direito e esquerdo, distam ao início e fim da FLDC $27,85 \pm 4,70$ mm e de $9,14 \pm 7,97$ mm (dto e esq), e $14,54 \pm 2,44$ mm e de $5,30 \pm 3,91$ mm (dto e esq) respectivamente.

O PCRP Glabela, dista ao início e fim da FLDC $13,87 \pm 2,32$ mm, e $7,35 \pm 1,24$ mm respectivamente

O PCRP Pterio direito e esquerdo, distam ao início e fim da FLDC $30,36 \pm 5,12$ mm e de $28,35 \pm 4,81$ mm (dto e esq), e $24,74 \pm 4,17$ mm e de $24,17 \pm 4,07$ mm (dto e esq) respectivamente.

Conclusões: À semelhança do que se passa com o Homem, os PCRP escolhidos apresentam uma repetibilidade evidente, validando a sua utilização no planeamento dos diferentes acessos cranianos possibilitando orientar a abordagem e trabalhar com maior segurança em neurocirurgia de crânio.

[Anatomotopography cranium encephalic relations between 5 main craniometric points landmarks and longitudinal dorsal brain fissure to neurosurgery procedures in brachycephalus dogs]

Introduction: Knowledge of the craniotopography relations, allows linking to external surface of the skull with brain regions that are located internally, enabling define in a better the neurosurgical procedures being performed. The choice of some main (PCRP) or secondary (PCRS) craniometric points landmarks with uniform location will function as a GPS system to access relevant brain structures (EEU) in different techniques neurosurgery.

Objectives: The aim of this work was the relations between 5 PCRP and Longitudinal Dorsal Brain Fissure (LDCF) in a backdrop of neuronavigation. **Materials and methods:** Using a sample of 69 (N=69) brachycephalus dog cadavers, the external surface of cranium was exposed with a biauricular cranial incision, rebating the temporal muscles and exposure of the cranial sutures. It was identified the 5 PCRP previous selected: Asterion, Bregma, Stephanion, Glabela and Pterion, where we developed holes of 1.5 mm in diameter witch throughout were introduced perpendicular to the surface cranial external peripheral catheters, that were subsequently cutted. After that, it was performed a circumferential necroscopic opening of skull and the dura mater, followed by a careful removal of the brain as a single block and the measurement between the sites of introduction of catheters from the skull and EEU in neurosurgery: Longitudinal Fissure Dorsal Brain (FLDC). Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS).

Results: The PCRP Asterion right and left, distance to the beginning and end of FLDC 62.08 ± 10.56 mm and 60.81 ± 10.34 mm (right and Left) and 50.62 ± 8.59 mm and 54.05 ± 9.18 mm (right and Left) respectively.

The PCRP Bregma, distance to the beginning and end of FLDC 35.31 ± 5.95 mm and 17.62 ± 2.96 mm respectively

The PCRP Stephanion right and left, Dist to the beginning and end of FLDC 27.85 ± 4.70 mm and 9.14 ± 7.97 mm (right and Left) and 14.54 ± 2.44 mm and 5.30 ± 3.91 mm (right and Left) respectively.

The PCRP Glabela, distance to the end of Home and FLDC 13.87 ± 2.32 mm and 7.35 ± 1.24 mm respectively

The PCRP Pterion right and left, Dist to the beginning and end of FLDC 30.36 ± 5.12 mm and 28.35 ± 4.81 mm (right and Left) and 24.74 ± 4.17 mm and 24.17 ± 4.07 mm (right and Left) respectively.

Conclusions: Similar to what is happening with the man, PCRP chosen showed repeatability, validating there use in the planning of the different cranial accesses allowing guide the approach and working with greater safety in brain neurosurgery.

Relações anatomotopográficas cranioencefálicas entre 5 pontos craniométricos de referencia e a fissura pseudosilviana para procedimentos de neurocirurgia em canídeos braquicéfalos

Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, UCH

Introdução: Conhecimento das relações anatomotopográficas cranioencefálicas, permite relacionar a superfície externa da calote craniana com as regiões encefálicas que se localizam internamente, possibilitando delimitar mais facilmente os acessos neurocirurgicos a realizar. A escolha de alguns pontos craniométricos referenciais principais (PCRP) ou secundários (PCRS) de localização uniforme permitirá funcionar como um sistema de GPS ao acesso a estruturas encefálicas úteis (EEU) em diferentes técnicas neurocirurgicas. **Objectivos:** Este trabalho objectivou avaliar as relações entre 5 PCRP e a Fissura Pseudosilviana (FPSlv) num cenário de neuronavegação. **Materiais e metodos:** Utilizando uma amostra de 69 (N=69) cadáveres de canídeos braquicéfalos, realizou-se a exposição da superfície craniana externa com uma incisão biauricular, rebatimento dos temporais e exposição das suturas cranianas. Identificaram-se os 5 PCRP seleccionados: Astério, Bregma, Estefânio, Glabela e Pterio, onde se realizaram orifícios de 1,5 mm de diâmetro por onde se introduziram perpendicularmente à superfície craniana externa, cateteres periféricos; os quais foram posteriormente cortados. Realizou-se a abertura circunferencial necroscópica do crânio e da Dura-máter seguida da remoção cuidadosa do encéfalo como um bloco único e da medição entre os locais de introdução dos cateteres a partir da calote craniana e a EEU em neurocirurgia: a Fissura Pseudosilviana (FPSlv). A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS). **Resultados:** O PCRP Astério direito e esquerdo, dista ao inicio e fim da FPSlv $35,61 \pm 6,02$ mm e de $38,65 \pm 6,54$ mm (dto e esq), e $28,39 \pm 4,80$ mm e de $35,38 \pm 5,98$ mm (dto e esq) respectivamente

O PCRP Bregma dista ao inicio e fim da FPSlv $26,90 \pm 4,54$ mm e de $32,37 \pm 5,47$ mm (dto e esq), e $29,02 \pm 4,90$ mm e de $33,68 \pm 5,69$ mm (dto e esq) respectivamente

O PCRP Estefânio direito e esquerdo, dista ao inicio e fim da FPSlv $25,76 \pm 4,34$ mm e de $23,53 \pm 3,96$ mm (dto e esq), e $20,78 \pm 3,49$ mm e de $23,29 \pm 3,92$ mm (dto e esq) respectivamente

O PCRP Glabela, dista ao inicio e fim da FPSlv $31,17 \pm 5,26$ mm e de $29,55 \pm 5,01$ mm (dto e esq), e $27,16 \pm 4,58$ mm e de $34,37 \pm 5,81$ mm (dto e esq) respectivamente

O PCRP Ptério direito e esquerdo, dista ao inicio e fim da FPSlv $19,49 \pm 3,27$ mm e de $12,80 \pm 2,14$ mm (dto e esq), e $11,38 \pm 1,91$ mm e de $10,07 \pm 1,69$ mm (dto e esq) respectivamente

Conclusões: Á semelhança do que se passa com o Homem, os PCRP escolhidos apresentam uma repetibilidade evidente, validando a sua utilização no planeamento dos diferentes acessos cranianos possibilitando orientar a abordagem e trabalhar com maior segurança em neurocirurgia de crânio.

[Anatomotopography cranium encephalic relations between 5 main craniometric points landmarks and sylvian fissure to neurosurgery procedures in brachycephalus dogs]

Introduction: Knowledge of the craniotopography relations, allows linking to external surface of the skull with brain regions that are located internally, enabling define in a better the neurosurgical procedures being performed. The choice of some main (PCRP) or secondary (PCRS) craniometric points landmarks with uniform location will function as a GPS system to access relevant brain structures (EEU) in different techniques neurosurgery. **Objectives:** The aim of this work was the relations between 5 PCRP and Sylvian Fissure (SlvF) in a backdrop of neuronavigation. **Materials and methods:** Using a 69 sample (N=69) brachycephalus dog cadavers, the external surface of cranium was exposed with a biauricular cranial incision, rebating the temporal muscles and exposure of the cranial sutures. It was identified the 5 PCRP previous selected: Asterion, Bregma, Stephanion, Glabela and Pterion, where we developed holes of 1.5 mm in diameter witch throughout were introduced perpendicular to the surface cranial external peripheral catheters, that were subsequently cutted. After that, it was performed a circumferential necroscopic opening of skull and the dura mater, followed by a careful removal of the brain as a single block and the measurement between the sites of introduction of catheters from the skull and EEU in neurosurgery: Sylvian Fissure (SlvF). Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS). **Results:** The PCRP Asterion right and left, distance to the beginning and end of SlvF 35.61 ± 6.02 mm and 38.65 ± 6.54 mm (righth and Left) and 28.39 ± 4.80 mm and 35.38 ± 5.98 mm (righth and Left) respectively. The PCRP Bregma, distance to the beginning and end of SlvF 26.90 ± 4.54 mm and 32.37 ± 5.47 mm (righth and left) and 29.02 ± 4.90 mm and 33.68 ± 5.69 mm (righth and left) respectively

The PCRP Stephanion right and left, Dist to the beginning and end of SlvF 25.76 ± 4.34 mm and 23.53 ± 3.96 mm (righth and Left) and 20.78 ± 3.49 mm and 23.29 ± 3.92 mm (righth and Left) respectively.

The PCRP Glabela, distance to the end of SlvF 31.17 ± 5.26 mm and 29.55 ± 5.01 (righth and left) and 27.16 ± 4.58 mm and 34.37 ± 5.81 mm (righth and left) respectively

The PCRP Pterion right and left, Dist to the beginning and end of SlvF 19.49 ± 3.27 mm and 12.80 ± 2.14 mm (righth and Left) and 11.38 ± 1.91 mm and 10.07 ± 1.69 mm (righth and Left) respectively.

Conclusions: Similar to what is happening with the man, PCRP chosen showed repeatability, validating there use in the planning of the different cranial accesses allowing guide the approach and working with greater safety in brain neurosurgery.

Relações anatomotopográficas cranioencefálicas entre 5 pontos craniométricos de referencia e o seio venoso central para procedimentos de neurocirurgia em canídeos braquicéfalos

Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, UCH

Introdução: Conhecimento das relações anatomotopográficas cranioencefálicas, permite relacionar a superfície externa da calote craniana com as regiões encefálicas que se localizam internamente, possibilitando delimitar mais facilmente os acessos neurocirúrgicos a realizar. A escolha de alguns pontos craniométricos referenciais principais (PCRP) ou secundários (PCRS) de localização uniforme permitirá funcionar como um sistema de GPS ao acesso a estruturas encefálicas úteis (EEU) em diferentes técnicas neurocirúrgicas.

Objectivos: Este trabalho objectivou avaliar as relações entre 5 PCRP e o Seio Venoso Central (SVC) num cenário de neuronavegação.

Materiais e metodos: Utilizando uma amostra de 69 (N=69) cadáveres de canídeos braquicéfalos, realizou-se a exposição da superfície craniana externa com uma incisão biauricular, rebatimento dos temporais e exposição das suturas cranianas. Identificaram-se os 5 PCRP seleccionados: Astério, Bregma, Estefânio, Glabela e Pterio, onde se realizaram orifícios de 1,5 mm de diâmetro por onde se introduziram perpendicularmente à superfície craniana externa, cateteres periféricos; os quais foram posteriormente cortados. Realizou-se a abertura circunferencial necroscópica do crânio e da Dura-máter seguida da remoção cuidadosa do encéfalo como um bloco único e da medição entre os locais de introdução dos cateteres a partir da calote craniana e a EEU em neurocirurgia: o Seio Venoso Central (SVC). A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS).

Resultados: O PCRP Astério direito e esquerdo, distam ao inicio e fim do SVCt $48,44 \pm 8,22$ mm e de $47,03 \pm 7,98$ mm (dto e esq), e $18,36 \pm 3,07$ mm e de $21,27 \pm 3,57$ mm (dto e esq) respectivamente

O PCRP Bregma, dista ao inicio e fim do SVCt $10,91 \pm 1,83$ mm e $38,55 \pm 6,53$ mm respectivamente

O PCRP Estefânio direito e esquerdo, dista ao inicio do SVCt $16,83 \pm 2,82$ mm e de $15,91 \pm 3,57$ mm (dto e esq), e $46,72 \pm 7,92$ mm e de $35,46 \pm 15,03$ mm (dto e esq) respectivamente

O PCRP Glabela, dista ao inicio e fim do SVCt $11,63 \pm 1,94$ mm e $53,78 \pm 9,13$ mm respectivamente

O PCRP Pterio direito e esquerdo, ao inicio e fim do SVCt $27,86 \pm 4,67$ mm e de $28,46 \pm 4,80$ mm (dto e esq), e $44,97 \pm 7,63$ mm e de $44,13 \pm 7,48$ mm (dto e esq) respectivamente.

Conclusões: A semelhança do que se passa com o Homem, os PCRP escolhidos apresentam uma repetibilidade evidente, validando a sua utilização no planeamento dos diferentes acessos cranianos possibilitando orientar a abordagem e trabalhar com maior segurança em neurocirurgia de crânio.

[Anatomotopography cranium encephalic relations between 5 main craniometric points landmarks and central venous synus to neurosurgery procedures in brachycephalus dogs]

Introduction: Knowledge of the craniotopography relations, allows linking to external surface of the skull with brain regions that are located internally, enabling define in a better the neurosurgical procedures being performed. The choice of some main (PCRP) or secondary (PCRS) craniometric points landmarks with uniform location will function as a GPS system to access relevant brain structures (EEU) in different techniques neurosurgery.

Objectives: The aim of this work was the relations between 5 PCRP and Central Venous Synus (CVS) in a backdrop of neuronavigation. **Materials and methods:** Using a 69 sample (N=69) brachycephalus dog cadavers, the external surface of cranium was exposed with a biauricular cranial incision, rebating the temporal muscles and exposure of the cranial sutures. It was identified the 5 PCRP previous selected: Asterion, Bregma, Stephanion, Glabela and Pterion, where we developed holes of 1.5 mm in diameter witch throughout were introduced perpendicular to the surface cranial external peripheral catheters, that were subsequently cutted. After that, it was performed a circumferential necroscopic opening of skull and the dura mater, followed by a careful removal of the brain as a single block and the measurement between the sites of introduction of catheters from the skull and EEU in neurosurgery: Central Venous Synus (CVS). Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS).

Results: The PCRP Asterion right and left, dist to the beginning and end of the SVCt 48.44 ± 8.22 mm and 47.03 ± 7.98 mm (righth and Left) and 18.36 ± 3.07 mm and 21.27 ± 3.57 mm (righth and Left) respectively. The PCRP Bregma, dist to the beginning and end of the SVCt $10.91 \pm 1.83 \pm 6.53$ mm and 38.55 mm respectively. The PCRP Stephanion right and left, dist to the start of the SVCt 16.83 ± 2.82 mm and 15.91 ± 3.57 mm (righth and Left) and 46.72 ± 7.92 mm and 35.46 ± 15.03 mm (righth and Left) respectively. The PCRP Glabela, dist to the beginning and end of the SVCt $11.63 \pm 1.94 \pm 9.13$ mm and 53.78 mm respectively. The PCRP Pterion right and left, dist to beginning and end of SVCt 27.86 ± 4.67 mm and 28.46 ± 4.80 mm (righth and Left) and 44.97 ± 7.63 mm and 44.13 ± 7.48 mm (righth and Left) respectively.

Conclusions: Similar to what is happening with the man, PCRP chosen showed repeatability, validating there use in the planning of the different cranial accesses allowing guide the approach and working with greater safety in brain neurosurgery.

Caracterização dos índices cefálicos numa população de canídeos braquicéfalos

Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, UCH

Introdução: O cão doméstico – *Canis familiaris*, apresenta uma elevada diversidade morfológica, que se expressa pelo grande número de raças existentes. Esta variabilidade, traduz-se numa dificuldade de uniformização dos indivíduos, pelo que se tem procurado desenvolver parâmetros que permitam agrupá-los dentro de um mesmo padrão. A consideração de 3 (três) tipos de crânios: Dolicocefalos, Mesacefalos e Braquicéfalos, permite reduzir a uma maior simplicidade esta questão da diferenciação morfológica craniana. O Perímetro Cefálico (PC), que se relaciona com o tamanho cerebral, e os índices: Horizontal (IH) (que relaciona no plano horizontal a largura máxima (Lgmax) com o comprimento máximo (Cpmax) da cabeça), Sagital (IS) (que relaciona no plano sagital a altura máxima (Altmax) e o Cpmax da cabeça) e Transversal (IT) (que relaciona a Altmax e a Lgmax da cabeça), constituem 4 destes parâmetros.

Objectivos: Este trabalho objectivou caracterizar o PC, o IH, o IS e o IT de uma população de canídeos braquicéfalos.

Materiais e métodos: Utilizando uma amostra de 81 (N=81) cadáveres de canídeos braquicéfalos, identificaram-se pontos cefalométricos (PCFR) de referencia e realizaram-se um conjunto de medidas entre eles, utilizando um paquímetro digital modelo SXG-110 com capacidade 150 x 0,01 mm. Os índices foram calculados. A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS).

Resultados: O valor médio da Altmax foi de $49,91 \pm 5,58$ mm com os valores mínimo e máximo de 42,6 mm e 66,6 mm respectivamente; do Cpmax de $77,6 \pm 10,30$ mm com os valores mínimo e máximo de 60,4 mm e 76,9 mm respectivamente; e da Lgmax de $66,7 \pm 11,51$ mm com os valores mínimo e máximo de 52,4 mm e 83,09 mm, respectivamente.

O PC, assumiu uma média de $79,9 \pm 10,57$ mm, com os valores mínimo e máximo de 60,4 mm e 10,8 mm, respectivamente. O IH, assumiu uma média foi de $0,857 \pm 0,07$, com os valores mínimo e máximo de 0,730 e 1,090, respectivamente. Para o IS, a média foi de $0,651 \pm 0,08$, com os valores mínimo e máximo de 0,490 e 0,810, respectivamente. Para o IT, a média foi de $0,763 \pm 0,12$, com os valores mínimo e máximo de 0,760 e 1,060, respectivamente.

Conclusões: A realização de medições entre certos PCFR permite o cálculo de índices cefálicos, possibilitando uniformizar quanto à sua morfologia os diferentes tipos de canídeos, classificando-os em braqui, dolico ou mesacefalos. A população de dolicocefalos estudada, apresentou um IH uma média de 85,7 %, o que está de acordo com a literatura existente que classifica de braquicéfalos como todos os indivíduos com uma cabeça muito larga e de comprimento curto e um IH > 81%.

[Characterization of cephalic index in a brachycephalus canine population]

Introduction: The domestic dog - *Canis familiaris*, presents a high morphological diversity, which is expressed by the large number of existing breeds. This variability, translates into a difficulty of standardizing individuals, so it has been developed some parameters that can group them within the same pattern. The consideration of 3 types of skulls: brachycephalus, dolichocephalus and mesacephalus allow us to reduce to a greater simplicity of this differentiation cranial morphology. The head circumference (PC) (which relates to the brain size), and the cephalic indices: horizontal (IH) (which relates in the horizontal plane the maximum width (Lgmax) with the maximum length (Cpmax) of the head), Sagittal (IS) (which relates in the sagittal plane the maximum height (Altmax) and Cpmax of the head) and transversal (IT) (which relates to Altmax and Lgmax head), constitutes 4 of these parameters.

Objectives: The aim of this study was to characterize the PC, the IH, the IS and IT of a brachycephalous canine population.

Materials and methods: Using a 81 sample (N=81) brachycephalus canine cadavers, and after the identification of some cephalometric referencial landmarks (PCFR) we took some measures among them, using a digital caliper SXG-110 model with a capacity 150 x 0.01 mm. The indexes are calculated. Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS).

Results: The average for Altmax was 49.9 ± 5.58 mm with the minimum and maximum values of 42.6 mm and 66.6 mm respectively; for Cpmax was 77.6 ± 10.30 mm with the minimum and maximum values of 60.4 mm and 76.9 mm respectively, and for Lgmax was 66.7 ± 11.51 mm with the minimum and maximum values of 52.4 mm and 83.09 mm respectively. The PC, assumed an average of 79.9 ± 10.57 mm, with the minimum and maximum values of 60.4 mm and 10.8 mm, respectively. For IH, the average was 0.857 ± 0.07 , with the minimum and maximum values of 0.730 and 1.09, respectively. For IS, the average was 0.651 ± 0.08 , with the minimum and maximum values of 0.490 and 0.810, respectively. For IT, the average was 0.763 ± 0.12 , with the minimum and maximum values of 0.760 and 1.06, respectively.

Conclusions: The achievement of measurements between certain PCFR allow the calculation of cephalic index, standardizing on its morphology between different types of dogs, classifying them into brachy, dolicho and mesacephalus. The dolichocephalus population studied, showed an IH with an average of 85.7%, according with the existing literature that classifies as brachycephalus all individuals with more width than long head and a IH > 81%.

A utilização da ultrassonografia no tecido cerebral de canídeo, como método de identificação das estruturas cerebrais para neuronavegação

Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Sales-Luis, J.P.¹, Liste, F.²

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, UCH

Introdução: A ecoencefalografia é um método com um elevado potencial em neurocirurgia. As características do encéfalo dos canídeos são difíceis de avaliar devido á sua grande variabilidade, pelo que é preciso possuir um bom conhecimento sobre a anatomia ultra-sonográfica normal do órgão, para se conseguir interpretar as suas modificações.

Objectivos: Este trabalho objectivou avaliar quais e como se apresentam as estruturas encefálicas que podem funcionar como pontos de referencia num cenário de neuronavegação.

Materiais e metodos: Realizaram-se craniotomias extensas em 69 (N=69) cadáveres expondo o tecido cerebral ainda coberto pela dura-máter. Utilizou-se uma estação de ultrassonografia modelo Aloka Pro-Sound SSD-3500 Plus, em Modo-B em tempo-real e uma sonda modelo UST-9104-5. A sonda colocada sobre a dura-máter, foi angulada no sentido craniocaudal permitindo obter de forma progressiva a visualização de cortes coronais, e depois angulada no sentido laterolateral para obter imagens sagitais do cérebro. Todas as imagens foram gravadas e revistas por 3 vezes.

Resultados: Foi possível identificar várias estruturas.

Conclusões: As estruturas cerebrais fácil e uniformemente identificadas, e que podem funcionar como referencias anatómicas para orientação durante a neuronavegação utilizando ultra-sons em tempo real foram: a Dura-máter, a Pia-mater, a Foice do cérebro, o Sulco Esplenico, Corpo Caloso, os Ventriculos Laterais, o III Ventrículo, o Nucleo Caudado, o Hipocampo, o Vermis do Cerebelo e a Membrana do Tentório do Cerebelo.

[The use of ultrasound as a method for identifaction of brain structures for neuronavigation procedures]

Introduction: The Echoencephalography is a method with a high potential in neurosurgery. Dogs brain characteristics are difficult to assess due to its great variability, so it is imperial to have a good knowledge of the normal brain anatomy ultrasound, to achieve a good interpretation of his modifications.

Objectives: The aim of this work is to evaluate what brain structures are always presented, so they can worked as a landmark in a neuronavigation scenario.

Materials and methods: There were made extensive craniotomies over a sample of 69 (N=69) cadaveres to expose the brain tissue still covered by Dura-mater. We used an ultrasound station, Pro-Sound model Aloka SSD-3500 Plus, in B-mode real-time and a probe model UST-9104-5. The probe was placed on the Dura-mater, was angled towards craniocaudal allowing more gradually views of coronal sections, and then angled towards laterolateral for sagital images of the brain. All images were recorded and reviewed by 3 times.

Results: It was possible to identify several structures.

Conclusions: The brain structures easily and uniformly identified, and that can serve as references for anatomical orientation during neuronavegação using ultrasound in real time were: the dura mater, the pia mater, the brain Flax, the Splenic Sulcus, corpus callosum , The lateral ventricles, the III ventricle, the caudatus nuclei, the hyppocampus, the vermis of Cerebellum and the membrane of the Cerebellum.

Estudo comparativo das variações intra-cirúrgicas da temperatura esofágica e rectal em canídeos submetidos a cirurgia de tecidos moles e ortopédica

Carreira, M.^{1,2}, Costa, A.¹, Mendes, E.¹, Durana, J.¹, Paulino, L.¹, Pargana, A.¹, Iglésias, L.¹, Azevedo, P.¹

1 Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis - CMVAA

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Introdução: A termorregulação é um processo integrado em que intervêm os seguintes sistemas e órgãos: sistema nervoso central (SNC), sistema músculo esquelético, aparelho cardiovascular, aparelho respiratório e pele. Durante a anestesia, a hipotermia é o resultado de uma perda de calor maior do que a sua produção, da depressão do SNC, da vasodilatação, da redução da produção de calor pelo músculo esquelético, das cavidades corpóreas abertas e da administração de líquidos frios. A monitorização da temperatura durante a anestesia e no período pós-cirúrgico imediato, deve ser analisada considerando a resposta concreta integrada que afecta cada espécie e os fármacos utilizados.

Objectivos: Este trabalho objectivou avaliar as possíveis diferenças registadas entre as temperaturas esofágica (TE) e rectal (TR), em canídeos anestesiados e intervençionados em cirurgia de tecidos moles e ortopédica.

Materiais e métodos: Todos os 81 doentes da amostra (N=81) foram sujeitos ao mesmo protocolo anestésico e analgésico. A indução foi conseguida com Propofol (4mg/Kg), seguida da manutenção com Isoflurano. A analgesia utilizou inicialmente Carprofeno (2 mg/Kg), Morfina (0.4mg/Kg), e intra-cirúrgicamente Fentanilo (0.002mg/Kg). A monitorização multiparamétrica com um NT MP1000, permitiu avaliar a TE e TR por meio de uma sonda do tipo 05100, em 2 momentos diferentes: M1 (início da cirurgia), M2 (entrada na sala de recobro). A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS).

Resultados: No que respeita à TE e TR, e em comparação com os valores de referencia em M1 ($37,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$) e ($37,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$) em cirurgia de tecidos moles respectivamente, verificou-se que os valores baixaram ao longo da intervenção assumindo valores em M2 de $35,9 \pm 0,8^\circ\text{C}$ e $35,7 \pm 1,3^\circ\text{C}$, para TE e TR respectivamente. A TE apresentou sempre valores maiores do que a TR com um mínimo $37,0^\circ\text{C}$ em M1 e de $34,9^\circ\text{C}$ em M2, comparativamente com os valores de $36,2^\circ\text{C}$ em M1 e $32,7^\circ\text{C}$ em M2 da TR.

Quanto à TE e TR, e em comparação com os valores de referencia em M1 ($37,0 \pm 0,7^\circ\text{C}$) e ($36,9 \pm 0,7^\circ\text{C}$) em cirurgia de ortopédica respectivamente, verificou-se que os valores baixaram ao longo da intervenção assumindo valores em M2 de $35,5 \pm 0,8^\circ\text{C}$ e $35,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$, para TE e TR respectivamente. A TE apresentou sempre valores maiores do que a TR com um mínimo $35,6^\circ\text{C}$ em M1 e de $33,5^\circ\text{C}$ em M2, comparativamente com os valores de $35,3^\circ\text{C}$ em M1 e $32,7^\circ\text{C}$ em M2 da TR.

Conclusões: A comparação entre TE e TR, permite concluir que a TE é mais representativa do que se passa na realidade quanto à termorregulação do doente durante os períodos operatório e peri-operatório, verificando-se uma diferença de $2,2^\circ\text{C}$ e de $0,8^\circ\text{C}$ em cirurgia de tecidos moles e ortopédica respectivamente, registadas com os dois métodos utilizados. A temperatura, assume-se assim como um factor importante na avaliação da condição clínica dos doentes principalmente em cirurgia de tecidos moles, se considerarmos que por vezes é atribuída a uma suposta hipotermia o quadro clínico apresentado no período pós-cirúrgico imediato, a qual poderá não ser real se considerarmos a temperatura real fornecida pela TE.

[Comparative study of oesophageal and rectal temperature in a canine population under orthopaedic and soft tissue surgery]

Introduction: The thermoregulation is an integrated process involving the following systems and organs: central nervous system (CNS), skeletal muscle system, cardiovascular, respiratory tract and skin. During anaesthesia, the hypothermia is the result of a loss of heat greater than its production, the depression of CNS, the vasodilatation, reducing the production of heat by skeletal muscle, the body cavities opened and the administration of cold liquids. Monitoring the oesophageal (TE) and rectal (TR) Temperature during anaesthesia and post-surgical period, it seems to be interesting to considering the specific integrated response that affects all species and the drugs used.

Objectives: The aim of this work was evaluate the possible changes recorded between TE and TR in a canine population under a soft tissue and orthopaedic surgery.

Materials and methods: All patients from a 81 sample (N=81) were submitted to the same anaesthetic and analgesic protocol. The induction was achieved with Propofol (4mg/kg), followed by maintenance with isoflurane. Analgesia used initially Carprofen (2 mg / kg), morphine (0.4mg/Kg), and intra-surgically Fentanyl (0.002mg/Kg). The multiparameter monitor used was a NT MP1000 model, allowing to evaluate the TE and TR through a probe type 05100 at 2 different times: M1 (the patient's arrival to the surgical table), M2 (exit patient's surgical table). Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS).

Results: Regarding the TE and TR, and compared with the values of reference in M1 ($37,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$) and ($37,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$) in soft tissue surgery, respectively, it was found that the values fall during the intervention taking values in M2 of $35,9 \pm 0,8^\circ\text{C}$ and $35,7 \pm 1,3^\circ\text{C}$, for TE and TR respectively. The TE had always higher values than the TR with a minimum of $37,0^\circ\text{C}$ in M1 and M2 in $34,9^\circ\text{C}$, compared with the values of $36,2^\circ\text{C}$ in M1 and $32,7^\circ\text{C}$ in M2 in RT.

As for TE and TR, and compared with the values of reference in M1 ($37,0 \pm 0,7^\circ\text{C}$) and ($36,9 \pm 0,7^\circ\text{C}$) in orthopaedic surgery, respectively, it was found that the values fell during the intervention taking values in M2 of $35,5 \pm 0,8^\circ\text{C}$ and $35,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$, for TE and TR respectively. The TE had always higher values than the TR with a minimum of $35,6^\circ\text{C}$ in M1 and M2 in $33,5^\circ\text{C}$, compared with the values of $35,3^\circ\text{C}$ in M1 and $32,7^\circ\text{C}$ in M2 in RT.

Conclusions: Comparing TE and TR, we can conclude that TE is more representative of what really is happening on the patient's thermoregulation during operative and peri-operative periods, existing a difference of about $2,2^\circ\text{C}$ and $0,8^\circ\text{C}$ in soft-tissues surgery and orthopaedic respectively, recorded with the two methods. Temperature, it is assumed as an important parameter in assessing the clinical condition of patients especially in soft tissues surgery, if we consider that sometimes it is attributed to a supposed hypothermia the clinical condition presented at the immediate post-surgical period, which can not be real if we consider the actual temperature provided by TE.

Estudo comparativo das variações da pressão arterial (sistólica/ diastólica/ média) em felídeos submetidos a cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica

Carreira, M.^{1,2}, Costa, A.¹, Mendes, E.¹, Fernandes, J.¹, Nobrega de Sá, F.¹

1 Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis - CMVAA

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Introdução: O grau de manipulação e o trauma cirúrgico dos doentes, varia consoante o tipo de intervenção a realizar, sendo mais agressivo em Ortopedia do que em Cirurgia de Tecidos Moles pelo que as alterações cardiovasculares serão sempre maiores nesta área. A Pressão Arterial (PA), definida como a força lateral exercida pelo sangue por unidade de área de parede vascular medida em mmHg, oscila em redor de um valor designado de Pressão Arterial Média (PAM), que se situa entre um valor máximo e um mínimo, chamados de Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Arterial Diastólica (PAD) respectivamente. A PAM é o principal determinante da perfusão tecidual, aceitando-se que o valor mínimo necessário para garantir uma boa perfusão é de 60 mmHg. A PA pode ser medida por métodos invasivos (cateterismo arterial) e não invasivos (Doppler e método oscilométrico).

Objectivos: Este trabalho objectivou avaliar as possíveis alterações registadas na PAS, PAD e PAM, em felídeos intervencionados em cirurgia de tecidos moles e ortopédica.

Materiais e metodos: Todos os 81 doentes da amostra (N=81) foram sujeitos ao mesmo protocolo anestésico e analgésico. A indução foi conseguida com Propofol (4 mg/Kg), seguida da manutenção com Isoflurano. A analgesia utilizou inicialmente Carprofeno (2 mg/Kg), Morfina (0.1mg/Kg), e intra-cirurgicamente Fentanilo (0.002mg/Kg). A monitorização multiparamétrica com um NT MP1000, permitiu avaliar a PAS, a PAD e a PAM por método oscilométrico, em 5 momentos diferentes: M1 (chegada do doente à mesa cirúrgica), M2 (incisão na pele), M3 (acto cirúrgico principal), M4 (sutura da pele) e M5 (saída do doente da mesa cirúrgica). A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS). **Resultados:** No que respeita à PAS, PAD e PAM e em comparação com os valores de referencia em M1 (119,5±40,3), (70,5±27,1) e (89,6±32,7) em cirurgia de tecidos moles, e M1 (103,2±32,1), (55,8±17,3) e (75,4±23,4) em cirurgia ortopédica respectivamente, verifica-se que as diferentes PA consideradas variam ao longo dos momentos cirúrgicos, com valores sempre mais elevados nas cirurgias ortopédicas na ordem de 4,23% em M2 (3,4%, 6,4% e 2,9%), 24,6% em M3 (29,3%, 20,2% e 24,3%), 6,1% em M4 (4,0%, 8,1% e 6,3%) e de 4,5% em M5 (3,1%, 10,4% e 0,2%). De verificar que a PAM, se manteve sempre acima dos 60 mmHg assegurando uma boa perfusão dos tecidos intervencionados, em ambos os tipos de cirurgia.

Conclusões: Os doentes de cirurgia ortopédica, apresentam maiores alterações nas PAS, PAD, PAM ao longo dos diferentes momentos cirúrgicos comparativamente à cirurgia de tecidos moles, permitindo concluir que se trata de um tipo de cirurgia de carácter mais agressivo onde existe um aumento das PA, resultante da libertação de maiores concentrações de adrenalina e noradrenalina e dos seus efeitos sobre os receptores α dos vasos sanguíneos, do que nas cirurgias de tecidos moles. Nos registos de cirurgia de tecidos moles todos os valores da PA diminuíram, o que permite concluir sob um bom protocolo analgésico, o estímulo cirúrgico não é suficientemente forte para promover uma boa resposta adrenérgica por parte do sistema simpático, o que não se passa com a cirurgia ortopédica onde a PA aumenta principalmente no momento de maior manipulação tecidual (M3).

[Comparative study of blood pressure (systolic / diastolic / mean) intra-surgical changes in a feline population under orthopaedic and soft tissue surgery]

Introduction: The degree of trauma and surgical manipulation of patients varies with the type of surgery to be implemented, being more aggressive in Orthopaedics Surgery than on soft tissue, and so the cardiovascular changes are always higher at first. The Blood Pressure (BP), defined as the lateral force exerted by blood per unit area of the vessel wall measured in mmHg, fluctuates around a value called the mean arterial pressure (MAP), which is between a maximum and a minimum, called the systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood (DBP) respectively. The WFP is the main determinant tissue perfusion, accepting that the minimum amount required to ensure a good infusion is 60 mmHg. The PA can be measured by invasive methods (arterial catheterization) and non-invasive (Doppler and oscillometric method).

Objectives: The aim of this work was to compare the possible changes recorded in the SBP, DBP and MAP in a feline population under a soft tissues surgery vs orthopaedic.

Materials and methods: All patients of a 81 sample (N=81) were submitted to the same protocol anaesthetic and analgesic. The induction was achieved with propofol (4 mg / kg), followed by maintenance with isoflurane. Analgesia used initially Carprofen (2 mg / kg), morphine (0.1mg/Kg), and intra-surgically Fentanyl (0.002mg/Kg). The multiparameter monitor used was a NT MP1000 model, allowing to evaluate the PAS, DAP and the WFP by oscillometric method, in 5 different times: M1 (the patient's arrival to the surgical table), M2 (incision in the skin) and M3 (major surgery), M4 (suturing the skin) and M5 (exit patient's surgical table). Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS).

Results: Regarding SBP, DBP and MAP and compared with the values of reference in soft-tissue surgery M1 (119.5 ± 40.3) (70.5 ± 27.1) and (89.6 ± 32.7), and orthopaedic surgery M1 (103.2 ± 32.1), (55.8 ± 17.3) and (75.4 ± 23.4) respectively, it appears that the various BP considered vary over the surgical moments, with figures always higher in orthopaedic surgery at the order of 4.23% in M2 (3.4%; 6.4%, 2.9%), 24.6% in M3 (29.3%, 20.2%, 24.3%), 6.1% in M4 (4.0%, 8.1%, 6.3%) and 4.5% in M5 (3.1%, 10.4%, 0.2 %). It is interesting to verify that the MAP, always remained above 60 mmHg ensuring a good tissue perfusion intervention, in both types of surgery.

Conclusions: nPatients of orthopaedic surgery, have major changes in SBP, DBP, MAP during the different stages of surgery compared with soft tissue surgery, allowing conclude that this is a type of surgery of a more aggressive where there is an increase in BP, resulting the release of higher concentrations of adrenaline and noradrenalin and their effects on α receptors of blood vessels, than in soft-tissue surgeries. In the records of soft-tissue surgery all values BP decreased, which gives a good analgesic protocol, the surgical stimulus is not strong enough to promote a good response from the adrenergic sympathetic system, which is not the case with the orthopaedic surgery where the PA increases primarily at the time of greatest tissue manipulation (M3).

Estudo comparativo das variações da pressão arterial (sistólica/ diastólica/ média) em cães submetidos a cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica

Carreira, M.^{1,2}, Costa, A.¹, Mendes, E.¹, Fernandes, J.¹, Nobrega de Sá, F.¹

1 Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis - CMVAA

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Introdução: O grau de manipulação e o trauma cirúrgico dos doentes, varia consoante o tipo de intervenção a realizar, sendo mais agressivo em Ortopedia do que em Cirurgia de Tecidos Moles pelo que as alterações cardiovasculares serão sempre maiores nesta área. A Pressão Arterial (PA), definida como a força lateral exercida pelo sangue por unidade de área de parede vascular medida em mmHg, oscila em redor de um valor designado de Pressão Arterial Média (PAM), que se situa entre um valor máximo e um mínimo, chamados de Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Arterial Diastólica (PAD) respectivamente. A PAM é o principal determinante da perfusão tecidual, aceitando-se que o valor mínimo necessário para garantir uma boa perfusão é de 60 mmHg. A PA pode ser medida por métodos invasivos (cateterismo arterial) e não invasivos (Doppler e método oscilométrico).

Objectivos: Este trabalho objectivou avaliar as possíveis alterações registadas na PAS, PAD e PAM, em cães intervencionados em cirurgia de tecidos moles e ortopédica.

Materiais e metodos: Todos da amostra de 81 (N=81) os doentes foram sujeitos ao mesmo protocolo anestésico e analgésico. A indução foi conseguida com Propofol (4 mg/Kg), seguida da manutenção com Isoflurano. A analgesia utilizou inicialmente Carprofeno (2 mg/Kg), Morfina (0.4mg/Kg), e intra-cirurgicamente Fentanilo (0.002mg/Kg). A monitorização multiparamétrica com um NT MP1000, permitiu avaliar a PAS, a PAD e a PAM por método oscilométrico, em 5 momentos diferentes: M1 (chegada do doente à mesa cirúrgica), M2 (incisão na pele), M3 (acto cirúrgico principal), M4 (sutura da pele) e M5 (saída do doente da mesa cirúrgica). A análise estatística foi conseguida com recurso ao Teste t, assumindo que a amostra tem uma distribuição gaussiana através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS).

Resultados: No que respeita à PAS, PAD e PAM e em comparação com os valores de referencia em M1 (113±25,3), (70,6±25,0) e (86,6±25,5) em cirurgia de tecidos moles, e M1 (115,2±38,0), (66,2±27,8) e (85,6±35,3) em cirurgia ortopédica respectivamente, verifica-se que as diferentes PA consideradas variam ao longo dos momentos cirúrgicos, com valores sempre mais elevados nas cirurgias ortopédicas na ordem de 9,46% em M2 (6,9%, 10,0% e 11,5%), 17,0% em M3 (13,3%, 20,4% e 17,4%), 15,9% em M4 (14,2%, 17,5% e 16,0%) e de 17,8% em M5 (13,1%, 24,8% e 15,6%). De verificar que a PAM, se manteve sempre acima dos 60 mmHg assegurando uma boa perfusão dos tecidos intervencionados, em ambos os tipos de cirurgia.

Conclusões: Os doentes de cirurgia ortopédica, apresentam maiores alterações nas PAS, PAD, PAM ao longo dos diferentes momentos cirúrgicos comparativamente à cirurgia de tecidos moles, permitindo concluir que se trata de um tipo de cirurgia mais agressiva, induzindo à libertação de maiores concentrações de adrenalina e noradrenalina e aos seus efeitos sobre os receptores α dos vasos sanguíneos do que nas cirurgias de tecidos moles. Quer em cirurgia de tecidos moles, quer em cirurgia ortopédica, existe sempre alteração das PA com um aumento em todos os momentos (M1,M2,M3,M4 e M5) considerados, o que permite concluir que o sistema simpático é sempre estimulado em maior ou menor grau, de acordo com as áreas cirúrgicas.

[Comparative study of blood pressure (systolic / diastolic / mean) intra-surgical changes in a canine population under orthopaedic and soft tissue surgery]

Introduction: The degree of trauma and surgical manipulation of patients varies with the type of surgery to be implemented, being more aggressive in Orthopaedics Surgery than on soft tissue, and so the cardiovascular changes are always higher at first. The Blood Pressure (BP), defined as the lateral force exerted by blood per unit area of the vessel wall measured in mmHg, fluctuates around a value called the mean arterial pressure (MAP), which is between a maximum and a minimum, called the systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood (DBP) respectively. The WFP is the main determinant tissue perfusion, accepting that the minimum amount required to ensure a good perfusion is 60 mmHg. The PA can be measured by invasive methods (arterial catheterization) and non-invasive (Doppler and oscillometric method).

Objectives: The aim of this work was to compare the possible changes recorded in the SBP, DBP and MAP in a canine population under a soft tissues surgery vs orthopaedic.

Materials and methods: All patients in a 81 sample (N=81) were submitted to the same protocol anaesthetic and analgesic. The induction was achieved with propofol (4 mg / kg), followed by maintenance with isoflurane. Analgesia used initially Carprofen (2 mg / kg), morphine (0.4mg/Kg), and intra-surgically Fentanyl (0.002mg/Kg). The multiparameter monitor used was a NT MP1000 model, allowing to evaluate the PAS, DAP and the WFP by oscillometric method, in 5 different times: M1 (the patient's arrival to the surgical table), M2 (incision in the skin) and M3 (major surgery), M4 (suturing the skin) and M5 (exit patient's surgical table). Statistical analysis was achieved using the t test, assuming that the sample has a Gaussian distribution through the Kolmogorov-Smirnov test (KS).

Results: Regarding SBP, DBP and MAP and compared with the values of reference in soft-tissue surgery M1 (113 ± 25.3) (70.6 ± 25.0) (86.6 ± 25.5), and orthopaedic surgery M1 (115.2 ± 38.0), (66.2 ± 27.8) (85.6 ± 35.3) respectively, it appears that the various BP considered vary over the surgical moments, with figures always higher in orthopaedic surgery at a level of M2 (6.9%; 10.0%, 11.5%), 17.0% in M3 (13.3%, 20.4%,17.4%), 15.9% in M4 (14.2%, 17.5%, 16.0%) and 17.8% in M5 (13.1%, 24.8%, 15.6%). It is interesting to verify that the MAP, always remained above 60 mmHg ensuring a good tissue perfusion intervention, in both types of surgery.

Conclusions: Patients of orthopaedic surgery, have major changes in SBP, DBP, MAP during the different stages of surgery compared with soft tissue surgery, allowing conclude that the first is a more aggressive type of surgery, inducing the release of higher concentrations of adrenaline and noradrenalin and their effects on α receptors of blood vessels than in soft-tissue surgeries. Whether surgery on soft tissues, either in orthopaedic surgery, you can always amend the PA with an increase at all times (M1, M2, M3, M4 and M5) considered, which indicates that the system is always nice stimulated at higher or lesser degree, according to the surgical areas.

Seroprevalência da anaplasmosse bovina em Portugal

Gomes, J., Rebêlo, E.

INRB IP, LNIV, Estrada de Benfca, 701, 1549-011 Lisboa

A anaplasmosse bovina é uma doença hemolítica dos bovinos, causada pela rickettsia *Anaplasma marginale* (Rickettsiales; *Anaplasmataceae*) e transmitida por artrópodes. A doença clínica é particularmente importante nesta espécie animal, mas outros ruminantes podem ficar permanentemente infectados e servir de reservatório da infecção. Estão também descritas outras espécies como o *A. centrale* e o *A. bovis* que parecem ser menos patogénicos assim como *Anaplasma phagocytophilum* que infecta os granulócitos de várias espécies animais e que tem potencial zoonótico. Os eritrócitos são os únicas células dos bovinos infectadas pelo *A. marginale* e cerca de 70% ou mais eritrócitos podem ficar infectados durante a fase aguda da doença. As células infectadas são subsequentemente fagocitadas pelas células reticuloendoteliais, no que resulta uma anemia moderada a severa e icterícia sem hemoglobulinemia e hemoglobulinuria. O período de incubação da infecção varia com o número de organismos da dose infectante e tem em média 28 dias. Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia, icterícia e frequentemente a morte em animais com mais de 2 anos. Os bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções persistentes caracterizadas por rickettsemias baixas e cíclicas. Estes animais, que irão permanecer infectados, adquirem uma imunidade para a vida e servem de reservatório da *A. marginale* para os ixodídeos vectores.

Um diagnóstico rápido e fiável dos bovinos infectados com *A. marginale* permite estabelecer medidas de controlo da doença, pelo que decidimos implementar um método de diagnóstico serológico no nosso laboratório e efectuar um rastreio quanto à presença deste agente em quatro regiões de Portugal Continental (Entre-o-Douro e Minho, Trás-os-Montes, Beira Litoral e Alentejo). Foram testadas 164 amostras com um teste baseado numa técnica de ELISA competitiva. Este estudo revelou uma prevalência de 71% na região do Alentejo, 15% na região de Trás-os-Montes, 10% na região de Entre-o-Douro e Minho e 10% na região da Beira Litoral.

[Seroprevalence of cattle anaplasmosis in Portugal]

Anaplasmosis is an infectious disease of cattle, causing destruction of the red blood cells caused by the rickettsia *Anaplasma marginale* (Rickettsiales; *Anaplasmataceae*). Clinical disease is particularly important in this species but other ruminants can become persistently infected with *A. marginale*. Other rickettsia species like *A. centrale* and *A. bovis* were also described but are less pathogenic. *A. phagocytophilum* infects granulocytic cells of several species and has zoonotic potential. The erythrocytes are the only bovine cells infected by *A. marginale* and 70% or more become infected during the acute disease. Infected red blood cells are phagocytized by bovine reticuloendothelial cells, resulting in the development of mild to severe anemia and icterus without hemoglobinemia and hemoglobinuria. The incubation period of infection varies with the number of organisms in the infective dose and has an average of 28 days. Clinical symptoms include fever, weight loss, abortion, lethargy, icterus, and often death in animals older than 2 years. Cattle that survive acute infection develop persistent infections characterized by cyclic low-level rickettsemia. Persistently infected or cattle have lifelong immunity and are resistant to clinical disease serve as reservoirs of *A. marginale* because they provide a source of infective blood to ticks. Rapid and accurate detection of *Anaplasma marginale*-infected cattle would enhance anaplasmosis control procedures so we decided to establish a diagnostic technique in our laboratory and conduct a serological survey on the presence of *Anaplasma marginale* on cattle in four regions of mainland Portugal (Entre-o-Douro e Minho, Trás-os-Montes, Beira Litoral and Alentejo). One hundred and sixty four serum samples were tested with a competitive ELISA test. This study revealed that 71% in Alentejo region, 15% in Trás os Montes, 10% in Minho and 10% in Beira Litoral had antibodies against *A. marginale*.

Prevalência e sazonalidade da infecção por *Babesia*, *Theileria* e *Anaplasma* em bovinos de carne numa exploração do Ribatejo

Antunes, G.M.¹, Farrim, A.C.P.², Madeira de Carvalho, L.M.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa; madeiradecarvalho@fmv.utl.pt

² Gabinete de Apoio Veterinário, Companhia das Lezírias S.A., Samora Correia.

A infecção por hemozoários em bovinos em pastoreio é extremamente importante sob o ponto de vista clínico-sanitário. A necessidade do seu melhor conhecimento numa exploração bovina de aptidão creatopoiética motivou um trabalho efectuado de Novembro de 2007 a Abril de 2008 na Companhia das Lezírias S.A. (CL) - Porto Alto, tendo como objectivo o estudo de prevalência em bovinos dos hemoparasitas dos géneros *Babesia*, *Theileria* e *Anaplasma*.

Foram colhidas amostras de sangue das campanhas de sanidade em 100 fêmeas adultas de aptidão “carne”, de raças Mertolenga e cruzada (MertolengaXCharolesa), através de punção da veia jugular. Foram elaborados 2-3 esfregaços sanguíneos por animal pela técnica de escorregamento, com coloração pela técnica de Giemsa. Procurou-se identificar corpos relativos a *Babesia* spp., *Theileria* sp. e *Anaplasma* spp., através da sua pesquisa em 50 campos microscópicos por esfregaço.

O estudo realizado permitiu aferir uma elevada prevalência de infecção por hemoparasitas (78%), pese embora o facto de haver uma quimioprofilaxia regular instaurada na CL. Os hemoparasitas mais prevalentes em todas as épocas de colheita foram os do género *Babesia* (76%), seguido pelos dos géneros *Anaplasma* (52%) e *Theileria* (27%). As infecções duplas mostraram-se favorecidas, sendo que a associação mais prevalente foi *Babesia*+*Anaplasma* (29%), associação estatisticamente significativa pelo teste de Fisher ($p < 0,0001$), o que permite considerar que o risco de infecção dos bovinos da CL por estes hemozoários é muito elevado. Embora os géneros *Babesia*, *Anaplasma* e *Theileria* tenham sido prevalentes por esta ordem durante toda a época do estudo, verifica-se que *Babesia* spp. e *Theileria* sp. apresentaram taxas de infecção mais elevadas no Outono/Inverno e *Anaplasma* na Primavera. Uma vez que as infecções de novos animais ocorrem sobretudo na Primavera/Verão (maior número de ixodídeos), seria de esperar uma maior prevalência nesta estação. Contudo, a percentagem de infecção superior no Outono/Inverno para *Babesia* e *Theileria* pode ser explicada pelas estações do ano com amplitudes térmicas menos evidentes (Outono/Inverno mais ameno), para além da pluviosidade e humidade regulares ao longo do ano. Isto implica uma ocorrência constante de ixodídeos e, conseqüentemente, elevadas prevalências de hemoparasitas nas épocas mais frias, quando normalmente ocorreriam em maior número na Primavera/Verão.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de estudos mais aprofundados acerca da epidemiologia destes hemoparasitas (ixodídeos vectores, susceptibilidade das diferentes raças de bovinos e eventuais reservatórios silvestres), para além da necessidade da realização de ensaios terapêuticos (com os fármacos já utilizados e outros), procurando atingir o controlo e a manutenção de um grau de infecção sustentável com bons índices de bem-estar e produção animal.

Estudo financiado pelo CIISA/FMV/UT.

[Prevalence and seasonality of infection by *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* in beef cattle on a farm in Ribatejo]

The hemozoan infection in grazing cattle is extremely important from a clinical and animal health point of view. The need of a better knowledge in a portuguese beef cattle farm led to a research performed from November 2007 to April 2008 in “Companhia das Lezírias, SA (CL) - Porto Alto, aiming a study of prevalence and seasonality of the bovine hemoparasites *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma*. Blood samples were collected during routine health campaigns in 100 adult cattle beef females of Mertolenga and cross breeds (MertolengaXCharolesa), through puncture of the jugular vein. 2-3 blood smears slides were prepared, with the Giemsa staining technique. Parasitic bodies of *Babesia* spp. *Theileria* sp. and *Anaplasma* spp. were searched in 50 microscopic fields per smear.

The study showed a high prevalence of infection by hemoparasites (78%), despite the fact of a regular chemoprophylaxis in CL bovines. The most prevalent hemozoan in all the harvest period were the *Babesia* ones (76%), followed by *Anaplasma* (52%) and *Theileria* (27%). The double infections were shown to be favoured and the most prevalent association was *Babesia*+*Anaplasma* (29%), statistically significant by Fisher's test ($p < 0.0001$), which makes it possible to consider that the risk of infection in CL beef cattle by these two parasites is very high.

Although *Babesia*, *Anaplasma*, and *Theileria* have been prevalent in this order for the entire season of the study, *Babesia* spp. and *Theileria* sp. had higher rates of infection in the autumn / winter and *Anaplasma* in spring. Since new infections occur mainly in spring/summer (due to high number of ticks), a higher prevalence in this season could be expected. However, the higher prevalence in autumn/winter for *Babesia* and *Theileria* can be explained by the seasons with less obvious temperature range (autumn/winter more mild), in addition to regular rainfall and humidity throughout the year. This implies a constant occurrence of ticks and hence high prevalence of hemoparasites in cooler seasons, when normally they used to occur in greater numbers in spring/summer. The results indicate the need for more in-depth studies about the epidemiology of these hemoparasites (tick vectors, susceptibility of different breeds of cattle and any wild reservoirs), in addition to the need of carrying out therapeutic trials (with drugs already used and others), seeking to reach the control and maintenance of a sustainable level of infection with good indexes of animal welfare and production.

Research funded by CIISA/FVM/TUL.

Parasitismo em bovinos da Raça Brava da ilha Terceira (Açores, Portugal) - dados preliminares

Crespo, M.¹, Rosa, F.², Correia, P.¹

¹ Escola Superior Agrária/Instituto Politécnico de Santarém, Apartado 310-2001 904 Santarém, maria.virginia@esa.ipsantarem.pt

² Instituto de Investigação Científica Tropical/JBT, Rua da Junqueira, 14, 1300-343 Lisboa, Portugal.

Na Ilha Terceira, apesar do gado de raça Brava ter um papel económico e sociocultural de relevo, nomeadamente na tradição da Tourada à Corda, única no país, pouco se conhece acerca da existência de estudos sobre a fauna parasitária destes animais e a sua repercussão em saúde e produção. Neste contexto, pretende-se contribuir para o seu conhecimento e quais as suas implicações em saúde animal. O presente estudo refere-se à colheita de Outono, das quatro estacionais programadas, no sentido de se avaliar o tipo e grau de parasitismo, a sua distribuição espacial e a variabilidade temporal em gado Bravo da Ilha terceira.

Na primeira semana do mês de Outubro de 2008 procedeu-se à colheita de 5% amostras de fezes de bovinos criados em regime extensivo em sete ganadarias localizadas no Concelho de Praia da Vitória (uma exploração) e no Concelho de Angra do Heroísmo (seis explorações), perfazendo um total de 70. As amostras foram sujeitas a análises coprológicas, com base em métodos qualitativos e quantitativos (técnicas de Willis, de sedimentação e de McMaster).

A eliminação de ovos e oocistos, foi registada em 33 (47,14 %) das amostras de fezes de bovinos. Identificaram-se ovos de *Moniezia benedeni* (4,29%) *Ascaridiidae* (1,43%), *Strongyloides* sp. (11,43%), strongilídeos gastrintestinais (EGI) (40,00%), *Trichuris* sp. (1,43%) e oocistos de *Eimeria* spp. (10,00%).

Embora os valores da eliminação parasitária tenham sido baixos, com 1 a 10 ovos, em quase todas as amostras analisadas, a prevalência das eliminações parasitárias por ganadaria oscilou entre 20,00% e 80,00%, sendo os valores máximos determinados nas amostras provenientes da exploração localizada no Concelho da Praia da Vitória e de uma outra no Concelho de Angra do Heroísmo (S. Bartolomeu), com 80,00% cada.

Predominaram as infecções simples com 63,64%, nas quais se salientaram as por EGI com 81,00%. Registaram-se ainda infecções duplas (27,27%) e triplas (9,09%).

Considerando os valores de prevalência, o grau de parasitismo, as associações parasitárias e a diversidade, identificou-se, em cada um dos Concelhos, uma exploração onde o risco de contaminação ambiental/reinfecção é mais elevado.

Estes resultados preliminares evidenciaram eliminações parasitárias baixas provavelmente relacionadas com os esquemas profiláticos implementados nas explorações e na dependência das condições ambientais menos favoráveis à manutenção das formas parasitárias infectantes no meio ambiente/pastagens neste período do ano, caracterizado por temperaturas e humidade elevadas.

[Parasitism in Brava breed from Terceira island (Azores, Portugal) - preliminary data]

In Terceira Island, fighting cattle in spite of having a relevant economical and sociocultural role, specifically by its tether bullfights, there are little data available on its parasitological fauna and its implications in animal health and production. In this context, this study aims to contribute to its knowledge and evaluate its repercussions in animal health. Though, the present study refers to the autumn observation period, out of the four seasonal periods, aiming to identify the type and the degree of helminthic parasites in fighting cattle from Terceira Island as well as its spatial and seasonal distribution/variability.

On the first week of October 2008, 5% faeces samples were collected on fighting cattle raised in extensive production system in seven farms, with an overall of 70 tests. Coprological exams were performed by qualitative and quantitative methods (spontaneous sedimentation and Willis and McMaster techniques).

Egg and oocysts output were detected in 33 (47.14 %) of cattle samples. Eggs of *Moniezia benedeni* (4.29%), *Ascaridiidae* (1.43%), *Strongyloides* sp. (11.43%), gastrointestinal strongylids (GIS) (40.00%), *Trichuris* sp. (1.43%) and oocysts of *Eimeria* spp. (10.00%) were identified.

Although the parasitological output values were low, with 1 to 10 eggs/oocysts, in almost all surveyed samples, the prevalence in each farm varied from 20.00% to 80.00%, with the higher values at the farm located in the Council of Praia da Vitória and at another one in the Council of Angra do Heroísmo (S. Bartolomeu), with 81.00% each.

Simple infections were prevalent with 63.64%, in which GIS infection were highlighted (80.00%). Co-infections by two parasites (27.27%) and by three (9.09%) were also registered.

Considering prevalence, degree, co-infections and biodiversity, a farm where the risk of environmental contamination/reinfection is higher was identified in each Council.

These preliminary data evidenced very light GIS egg output probably related to the efficiency of prophylactic programs ongoing, and influenced by the local climatic conditions, which did not favour the establishment of infectious parasitological stages in the environment/pastures in this specific period of the year, characterized by high temperatures and humidity.

Epidemiologia molecular de *S. uberis* de mastites de bovinos em explorações Portuguesas

Rato, M.G.¹, Bexiga, R.², Nunes, S.F.², Cavaco, L.M.², Vilela, C.L.², Santos-Sanches, I.¹

1 Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal; isanches@fct.unl.pt

2 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

Streptococcus uberis é um dos principais agentes patogénicos causadores de mastite bovina. Para desenvolver programas adequados de controlo da doença em explorações leiteiras, é necessário conhecer a epidemiologia molecular deste microrganismo, assim como identificar possíveis reservatórios de infecção. A população clonal de *S. uberis* associada a mastite bovina em explorações Portuguesas não é conhecida. Este estudo incidiu na caracterização, por electroforese em campo pulsado (PFGE), de 30 isolados de campo de *S. uberis*, recolhidos a partir de 459 amostras de leite de quartos que apresentavam mastite subclínica, de 377 bovinos leiteiros em 12 explorações leiteiras durante 2002/03, de forma a avaliar se os episódios de mastite subclínica estavam associados a múltiplas estirpes com tipos de PFGE distintos ou associados a um número limitado de estirpes ou clones com tipos de PFGE idênticos. Todos os isolados foram identificados como *S. uberis* utilizando sistemas bioquímicos (API-20 STREP - bioMérieux, Marcy l'Etoile, France; BBL Crystal Gram Positive - Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ), e amplificação do gene 16S rDNA por PCR. Os padrões electroforéticos obtidos por PFGE foram analisados visualmente e através de dendrogramas obtidos com o programa informático 'BioNumerics' (Applied Maths). Padrões de PFGE relacionados, com pelo menos 80% de semelhança, foram subdivididos em subtipos. Padrões de PFGE com menos de 80% de semelhança foram considerados distintos. Os padrões electroforéticos dos 30 isolados revelaram 18 tipos de PFGE, dos quais 3 incluíam cerca de metade dos isolados (46,6%). Estes tipos de PFGE maioritários (clonais) estavam associados a explorações específicas, sugerindo que a transmissão entre animais da mesma vacaria pode ocorrer ou que a infecção pode ser causada por isolados provenientes do mesmo reservatório ambiental. Os restantes tipos de PFGE estavam associados a diferentes explorações leiteiras sugerindo fontes ambientais de infecção. Em conclusão, apesar de se considerar *S. uberis* um agente patogénico de origem ambiental, este microrganismo pode ser transmitido entre animais, em particular em explorações incluídas neste estudo. Os resultados deste estudo apoiam esta hipótese, uma vez que observou-se um número limitado de tipos de PFGE dominantes que se disseminaram em duas explorações. A aquisição de isolados da mesma fonte ambiental é também uma hipótese, no entanto, as explorações leiteiras incluídas neste estudo consistem do tipo de produção intensiva, pelo que infecção a partir de fontes ambientais tais como pastagens, não é provável. No futuro, será importante clarificar a importância dos reservatórios ambientais na incidência da infecção, através de estudos de epidemiologia molecular em isolados recolhidos de diferentes locais dos bovinos, assim como de locais ambientais que envolvam os animais.

[Molecular epidemiology of *S. uberis* associated with bovine mastitis from Portuguese dairy farms]

Streptococcus uberis is one of the principal causative agents of bovine mastitis. The ability to formulate effective management practices in dairy herds to control *S. uberis* infection, should rely on the molecular epidemiology of this organism as well as on the identification of reservoirs of infection. However, the clonal population of *S. uberis* causing mastitis in Portuguese herds is unknown. Our aim was to characterize, by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), a collection of 30 *S. uberis* field isolates, recovered among 459 milk samples from 377 bovines with subclinical mastitis in 12 farms during 2002/03, in order to assess if subclinical bovine mastitis episodes were associated with multiple strains of distinct PFGE types or with a limited number strains or clones sharing identical PFGE types.

All isolates were identified as *S. uberis* by using biochemical identification systems (API-20 STREP - bioMérieux, Marcy l'Etoile, France and BBL Crystal Gram Positive - Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) and by PCR amplification of the 16S rDNA gene. DNA banding patterns obtained by PFGE were analysed visually and through dendrograms generated by the BioNumerics v. 4.0 software (Applied Maths). Related PFGE patterns with at least 80% similarity were assigned to different subtypes of a same PFGE type. PFGE patterns with less than 80% similarity were considered as distinct types. The 30 isolates were clustered into 18 PFGE types, out of which three accounted for almost half of the isolates (46.6%). These major types were herd specific, suggesting either cow-to-cow transmission or infection with isolates from the same environmental reservoirs. The remaining unrelated PFGE types were from different herds strongly suggesting environmental sources of *S. uberis* infection. In conclusion, it seems that although *S. uberis* is traditionally classified as an environmental mastitis pathogen, it may also be transmitted from cow-to-cow, particularly among these Portuguese farms. The PFGE analysis in the present study supports this view, as it was observed a limited number of dominant PFGE types spread in two farms. Nevertheless, acquisition from a common source may also be occurring; however, because all farms were zero-grazed, infection with *S. uberis* from environmental reservoirs, such as pastures, was not expected. Clarification of the importance of these environmental reservoirs to the incidence of infection by studying, by molecular typing tools, isolates collected from different sites on the cow and environmental sites will be required in the future.

Staphylococci coagulase-negativos e mastites bovinas – ainda agentes patogénicos menores?

Bexiga, R.¹, Oliveira, M.¹, Carneiro, C.¹, Ellis, K.² e Vilela, C.L.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² University of Glasgow Veterinary Faculty, Escócia

Os staphylococci coagulase-negativos (SCN) são frequentemente agrupados e não identificados até à espécie quando isolados de casos de mastite bovina. Estes são tradicionalmente vistos como agentes patogénicos menores porque não levam frequentemente a casos de mastite clínica, o impacto na contagem de células somáticas (CCS) tende a ser baixo, as taxas de cura após terapia antimicrobiana tendem a ser elevadas e a transmissão na sala de ordenha não parece ser frequente. Este grupo é todavia comumente citado como o mais frequentemente isolado de infecções intra-mamárias (IIM). No presente estudo tentámos clarificar algumas questões por responder acerca deste grupo: a) existem diferenças entre espécies no que diz respeito a CCS e persistência das IIM? b) os SCN são verdadeiramente responsáveis pela CCS elevadas ou são simplesmente mais fáceis de isolar que agentes patogénicos subjacentes, verdadeiramente responsáveis pelas IIM?

Quatro explorações leiteiras foram incluídas no estudo, com visitas a cada vacaria de quatro em quatro semanas, durante 20 semanas. Amostras de leite de quartos individuais foram recolhidas de vacas com mastite subclínica, definida por um aumento de CCS em contrates leiteiros sucessivos, até 12 vacas por visita. Vacas das quais SCN foram isolados na primeira visita, foram submetidas a colheita em visitas seguintes. A recolha de amostras e bacteriologia foram realizadas de acordo com protocolos padrão (National Mastitis Council). Cocos Gram-positivos catalase-positivos foram identificados até à espécie por um sistema de identificação bioquímica (ID32 Staph, bioMérieux). As amostras de leite foram subdivididas em duas alíquotas: uma para determinação de CCS (Fossomatic) e outra para congelação a -20 °C. Bacteriologia foi realizada como anteriormente a partir das amostras de leite congeladas durante 24 horas, mas sem identificação até à espécie.

Taxas de cura presumptivas (um teste bacteriológico negativo, após um positivo) foram 37% após um mês, 15% após dois e 6% após três meses. Taxas de cura após um mês por espécie foram 13% para *S. simulans*, 14% para *S. chromogenes* e 44% para *S. epidermidis*. A média geométrica de CCS foi 183.000 cells/ml for *S. chromogenes*, 168.000 para *S. simulans* e 130.000 para os staphylococci que não o *S. aureus*. Houve uma diferença significativa entre o número de isolamentos em amostras pré-congelação e pós-congelação em várias categorias bacterianas, incluindo 225 cocos Gram-positivos catalase-positivos (presumidamente staphylococci) isolados pré-congelação e 152 pós-congelação.

Apesar de preliminares, estes resultados sugerem que *S. simulans* e *S. chromogenes* são mais persistentes e levam a CCS mais elevadas do que outras espécies de SCN. Apenas congelar as amostras de leite não permite a recuperação de mais agentes patogénicos “maiores”.

[Coagulase-negative staphylococci and bovine mastitis – still minor pathogens?]

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are often reported as a group and not identified to species level when isolated from bovine mastitis cases. These bacteria are traditionally regarded as minor mastitis pathogens because they do not often lead to clinical mastitis cases, impact on somatic cell count (SCC) tends to be low, cure rates after antimicrobial therapy tend to be high and transmission in the milking parlour does not seem frequent. This group is however often cited as the most frequently isolated group of pathogens from bovine intramammary infections (IMI), with a reported higher incidence in heifers. In the current study we tried to clarify some unanswered questions about this group. These included a) are there differences in SCC and persistence of IMI caused by different species? b) are CNS truly responsible for high SCC or are they simply easier to isolate than an underlying pathogen responsible for the IMI?

Four dairy farms were included in the study, with farm visits performed every four weeks to each farm, for 20 weeks. Quarter milk samples were collected from cows with recent subclinical IMIs, defined by an increase in SCC at successive milk recordings, up to a total of 12 cows per visit. Cows from which CNS were isolated in the initial visit were sampled on subsequent visits. Sampling and bacteriology were performed according to standard protocols (National Mastitis Council). Gram-positive catalase-positive cocci, were identified to species level by their biochemical profile (ID 32 Staph, bioMérieux). Milk samples were subdivided into two aliquots: one for SCC determination (Fossomatic) and another for freezing at -20 °C. Standard bacteriology was performed on milk samples after freezing for 24 h, but with no identification to species level.

Presumed cure rates (one negative, after one positive bacteriology result) were 37% after one month, 15% after two and 6% after three months. Cure rates after one month per species were 13% for *S. simulans*, 14% for *S. chromogenes* and 44% for *S. epidermidis*. The SCC geometric mean was 183.000 cells/ml for *S. chromogenes*, 168.000 for *S. simulans* and 130.000 for all the non-aureus staphylococci. There was a significant difference between the number of isolations in pre-freezing and post-freezing samples over several bacterial categories, which included 225 Gram-positive catalase-positive cocci (presumably staphylococci) isolates pre-freezing and 152 post-freezing.

Although preliminary, these results suggest that *S. simulans* and *S. chromogenes* are more persistent and lead to higher SCC than other CNS species. Simply freezing the milk samples does not allow retrieving more “major pathogens”. Further work is still ongoing.

Aspectos da epidemiologia da infecção do vírus da diarreia viral bovina nos Açores

Benevides, S., Flor, L., Hernani, M.

Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário, Direcção de Serviços de Veterinária, Laboratório Regional de Veterinária

Introdução: O vírus da diarreia viral bovina (BVD), agente patogénico muito comum em populações de bovinos em todo o mundo, pode causar consideráveis prejuízos em explorações infectadas, devido ao seu vasto efeito quer na saúde dos bovinos como na produção, incluindo redução na produção de leite, diminuição da performance reprodutiva, atraso no crescimento, diarreias graves, refugo precoce e aumento da mortalidade, sobretudo em animais mais jovens. Se a infecção com o vírus BVD ocorrer em fêmeas entre os 40 e 120 dias de gestação existe o risco de nascerem vitelos imunotolerantes ao vírus e que permanecem persistentemente infectados para toda a vida (Niskanen *et al.*, 1996). Estes animais são responsáveis pela eliminação permanente de vírus para o ambiente, contaminando os animais cohabitantes e são conhecidos como animais PI (persistentemente infectados).

O primeiro objectivo do trabalho foi determinar a proporção de animais com níveis de anticorpos positivos contra o vírus BVD (seroprevalência) e a prevalência de explorações com animais seropositivos (animais com níveis de anticorpos positivos contra o vírus BVD) nas ilhas dos Açores. O segundo, consistiu na avaliação da prevalência de animais PI nos Açores.

Material e métodos: Foram colhidas amostras de soro de bovinos em todas as ilhas dos Açores (n=31106), no âmbito do Plano Global de Sanidade Animal, para detecção de anticorpos contra o vírus BVD pelo método imunoenzimático ELISA. Utilizou-se o método de amplificação de ácidos nucleicos, Real Time PCR, para detecção de animais PI também em amostras de soro.

Resultados: A seroprevalência entre animais nos Açores foi de 57,5%, a prevalência de explorações com animais seropositivos foi de 84,2% e a prevalência de animais PI foi de 0,2%.

[Epidemiological aspects of the bovine viral diarrhoea virus infection in the Azores]

Introduction: The bovine viral–diarrhoea virus (BVDV) is a common pathogen in cattle population worldwide and has got the potential to cause considerable damage in infected herds due to its broad effect on health and production, including reduced milk production, reduced reproductive performance, growth retardation, increased occurrence of other diseases, unthriftiness, early culling and increased mortality especially among young stock. However, infection during days 40th-125th of gestation may result in transplacental infection and the birth of persistently infected (PI) and immunotolerant calves. PI animals are considered the most important source of virus spread within and between herds.

Objective: The first objective of the work was to determine the proportion of animals with positive levels of antibodies against BVD virus (seroprevalence) and the prevalence of herds with seropositive animals (animals with positive levels of antibodies against BVD virus) in the all islands of the Azores. The second objective was to determine the prevalence of PI animals in the Azores.

Material and Methods: Bovine serum samples were collected in all islands of the Azores (n=31106), in the ambit of the Global Plan of Animal Health, for detection of antibodies against BVD virus using the immunoenzymatic method ELISA. The amplification of nucleic acids method, Real Time PCR was used for detection of PI animals, also in serum samples.

Results: The seroprevalence between animals in the Azores was 57.5%, the prevalence of herds with seropositive animals was 84.2% and the prevalence of PI animals was 0.2%.

Incidência e distribuição de patologias em efectivos bovinos leiteiros de alta produção na região de Aveiro

Castro, D.¹, Ribeiro, C.¹, Simões, J.²

1 Centro Veterinário de Aveiro

2 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

O objectivo do presente trabalho foi caracterizar a incidência e distribuição de patologias em explorações modernas de bovinos leiteiros da região de Aveiro. As ocorrências foram registadas com auxílio do programa informático ReproGTV®, em 6 explorações provenientes de diferentes partes do distrito, entre Novembro de 2006 e 2007 e vacinadas frente a IBR/BVD, pelo menos nos últimos 3 anos. O número médio de vacas em lactação foi de $118,80 \pm 38,75$ (\pm DP), com idade média de $4,07 \pm 0,02$ anos. A produção leiteira aos 305 dias foi de $9373,00 \pm 924,70$ kg. A produção total por vaca foi de $11294,00 \pm 1403,92$ kg com uma duração de lactação média de $383,80 \pm 20,09$ dias. Neste período foram diagnosticadas 413 patologias. Em 60% das patologias foram observados problemas reprodutivos (17% de vacas repetidoras e 5% de metrites), locomotores (12% de alterações músculo-esqueléticas e 8% de laminites) e mamites (18%). Em 27% foram diagnosticados problemas metabólicos (12% de deslocamentos do abomaso, 10% de cetose, 3% de hipocalcémias e 2% da síndrome da vaca caída). Observaram-se, ainda, partos distócicos que corresponderam a 3% das ocorrências. As restantes 10% de ocorrências foram devidas a situações de etiologia não esclarecida e a diversas doenças de origem infecto-contagiosa com destaque para o diagnóstico serológico (ELISA) de paratuberculose. Estas patologias (343/413; 87%), com a excepção das vacas repetidoras foram observadas durante os primeiros 47 dias pós-parto. Em 63% (286/413) dos casos foram diagnosticadas até aos 21 dias pós-parto. Estes resultados confirmam que o período crítico da saúde de vacas de alta produção ocorre nos primeiros 1,5 meses pós-partos. Enfatizam, ainda, a necessidade de monitorização veterinária e zootécnica intensa durante o período de pós-parto. A incidência de doenças de foro metabólico e relacionadas sugerem especial atenção para medidas preventivas que minimizem o balanço energético negativo. Do mesmo modo, o controlo de mamites assume especial importância para este período.

[The incidence and distribution of diseases in dairy cattle farms of northwestern Portugal]

The aim of the present study was to characterise the incidence and distribution of dairy cattle diseases in six modern farms located in the Aveiro region. After diagnosis, all pathological occurrences were registered using the ReproGTV® software tool between November 2006 and November 2007. An IBR/BVD vaccination program was performed in all farms, at least in the last 3 years. The mean number of cows in lactation was 118.80 ± 38.75 (\pm SD) with a median age of 4.07 ± 0.02 years. The 305-days milk production was 9373.00 ± 924.70 kg. The total milk production per cow was 11294.00 ± 1403.92 kg with a mean lactation length of 383.80 ± 20.09 days. During this period, a total of 413 cases were diagnosed. In 60% of the cases the dairy cattle presented reproductive problems (17% of repeat breeder cows and 5% of metritis), locomotor diseases (12% of muscle skeletal affections and 8% of laminitis) and mastitis (18%). In 27% of cows metabolic alterations were observed (12% of abomasal displacement, 10% of cetosis, 3% of hypocalcaemia, and 2% of downer cow syndrome). The abnormal (dystocia) parturition was observed in 3% of the cases. The remaining 10% of occurrences were classified as unknown causes or others infectious diseases like ELISA diagnosis of paratuberculosis. Except repeat breeder cows, all of these pathologies (343/413; 87%) were diagnosed until 47 days post-partum. In 63% (286/413) of the cases, the diagnosis was performed until 21 days post-partum. The results confirm that the first 1.5 month after calving is a critical period, related to heath, for high lactating dairy cattle. An intensive health evaluation and care is necessary during this period. The incidence of metabolic and related disease observed in this work suggests a special attention for preventive measures to minimize the negative energetic balance. A program of mastitis prophylaxis before calving is also important.

Resolução de torções uterinas por método de rolamento em vacas: um estudo retrospectivo de 9 casos

Simões, J.¹, Teixeira, F.², Mascarenhas, R.³

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

2 Profissional Liberal, 5370 Mirandela

3 INRB-EZN, 2005 Santarém

Este trabalho teve como objectivo caracterizar a apresentação e evolução clínica da torção uterina (TU) em vacas da raça Holstein-Frisia e a sua resolução obstétrica por método de rolamento. Entre os anos de 2002 e 2008, foram assistidas, no parto, 9 vacas com diagnóstico de torção uterina realizado por palpação vaginal e transrectal. A direcção da TU foi classificada em direita ou esquerda, através da identificação do sentido das pregas vaginais, e a localização em ante-cervical ou pós-cervical. O grau de torção foi avaliado através da posição relativa das diversas estruturas uterinas e do feto e foi classificado em $<90^\circ$, entre 90° e 180° (TU parciais) ou $>180^\circ$ (TU total). As manobras tocológicas consistiram no rolamento da vaca com apoio de uma prancha no abdómen e monitorização vaginal da rotação do útero. O momento do início da extracção vaginal do feto foi classificado em <60 vs >60 minutos após reposição uterina. Foi, ainda, registada a viabilidade fetal e da mãe e os resultados da necrópsia desta última, em caso de morte. Em 88,9% (8/9; $P<0,001$) das vacas a torção foi para o lado esquerdo, e somente em 22,2% (2/9; $P<0,05$) delas se localizou ante-cervical. Em 22,2% (2/9) das vacas a TU foi $<90^\circ$, em 44,5% (4/9) situou-se entre 90° e 180° e em 33,3% (3/9) $>180^\circ$ ($P>0,05$). Somente num caso (1/9; $P<0,001$) foi necessário esperar mais de 60 minutos para ocorrer dilatação suficiente das pregas cervicais. Dos 9 partos observados, seis foram nados-vivos e três nados-mortos, dois dos quais provenientes de TU totais. A mortalidade materna foi de 22,2% (2/9; $P<0,05$) e ocorreu nas vacas com TU totais, uma delas com ruptura uterina. Podemos concluir que o método, não cruento, de rolamento assistido da vaca para resolução de TU parcial é eficaz. A dilatação cervical observada até 1 hora após rolamento foi suficiente para a extracção vaginal da maioria dos fetos. No entanto, são necessárias mais observações de TU total para verificar se existe efeito adverso do rolamento que possa ser associado a um maior grau de debilidade do animal.

[Treatment of uterine torsion by rolling the cow: a retrospective study of 9 cases]

The aim of this study was to characterise the clinical management and evolution of Holstein-Frisian cattle presenting uterine torsion and treated by rolling the cows with a plank. At parturition, a uterine torsion was diagnosed by vaginal and transrectal palpation in nine cows between 2002 and 2008. The direction of torsion was classified in right (clockwise) or left (counterclockwise) by position of the vaginal folds. The local was classified in ante-cervical (vaginal involvement) or post-cervical position. The degree of uterine torsion was evaluated by the relative position of uterine structures, including the fetus and classified $<90^\circ$, between 90° and 180° (partial uterine torsion) or $>180^\circ$ (total uterine torsion). The obstetrical approach was performed by rolling the cow aided by a plank and monitoring the detorsion of the uterus by vaginal examination. The onset of vaginal fetus extraction was classified in <60 vs >60 minutes after the uterine reposition. The viability of fetus and mother was registered, with necropsy examination if the cow died. A counterclockwise torsion occurred in 88.9% (8/9; $P<0.001$) of the cows. The ante-cervical position was observed only in 22.2% (2/9; $P<0.05$) of the cows. The uterine torsion was $<90^\circ$ in 22.2% (2/9), between 90° and 180° in 44.5% (4/9) and $>180^\circ$ in 33.3% (3/9; $P>0,05$) of the cows. A delay >60 minutes was necessary for the cervix dilatation and fetus delivery in a case. Six alive and three dead fetuses (two of them from cows with total uterine torsion) were observed. The mother mortality was 22.2% (2/9; $P<0.05$), and all from cows with total uterine torsion. Uterine rupture was observed in one of these cows. We conclude that this non-surgical method of uterine torsion resolution is efficient. The cervical dilatation observed until 1 hour after the rolling was sufficient for calf vaginal delivery, in most of the cases. However, more studies were necessary in order to verify or confirm the existence of any adverse effect of this method when used in cows with total uterine torsion.

Efeito da selecção genética na expressão e actividade das enzimas reguladoras do metabolismo intermediário no coelho

van Harten, S.^{1,2}, Cardoso, L.A.^{1,2}

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

2 Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa

O objectivo deste trabalho foi a identificação da evolução da actividade e da expressão genética de enzimas reguladoras do metabolismo intermediário em duas subespécies de coelhos: *Oryctolagus cuniculus algirus*, o coelho bravo (WR) e uma raça de carne de alta produtividade, *Oryctolagus cuniculus cuniculus* (coelho NeoZelandês-NZ). Os grupos experimentais foram sujeitos a restrição alimentar (30% da alimentação ad libitum) durante 30 dias, resultando numa perda de peso de 17,7% nos NZ (n=11) e 21,7% nos WR (n=10). Os grupos controlo foram alimentados ad libitum (NZ, n=10; WR, n=9). Os nossos resultados das actividades das enzimas sugerem que os NZ apresentam um melhor controlo da glicemia e uma maior disponibilidade energética dos substratos através das acções das enzimas HK, PFK e PK. Os resultados do estudo do metabolismo proteico mostram que o grupo WR apresenta um nível de actividade inferior na desaminação do glutamato. Apesar dos WR apresentarem um nível superior do mRNA da HL, foram encontrados níveis semelhantes dos NEFA em ambos os grupos. Este perfil enzimático do metabolismo proteico e lipídico pode explicar os melhores desempenhos da raça NZ. Os nossos resultados mostram que o nível do mRNA pode não ser indicador fiável da actividade das respectivas enzimas. Das hormonas estudadas verifica-se que a insulina desempenha um papel na homeostase da glicemia, o T3 e o IGF-1 parecem desempenhar funções importantes na produtividade aumentada da raça NZ, com o T3 a intervir nos mecanismos de poupanças energéticas nos animais em restrição e o IGF-1 com a conhecida função anabólica no metabolismo proteico.

[Effects of genetic selection on the expression and activity of intermediate metabolism regulatory enzymes in the rabbit]

The aim of this work was the identification of intermediate metabolism enzyme gene expression and activity enhancing the improvement of meat production due to genetic selection in two subspecies of rabbits: *Oryctolagus cuniculus algirus*, a wild rabbit breed and a highly meat selected breed, *Oryctolagus cuniculus cuniculus* (New Zealand rabbit). In order to achieve these objectives both groups were subjected to a restricted diet (30% of ad libitum feeding) during 30 days, resulting in a 17.7% weight loss in the NZ rabbit (n=11) and 21.7% in the WR (n=10). Control groups were fed ad libitum (NZ, n=10; WR, n=9) Our results regarding the enzymes activities, suggest that NZ rabbits have a better glycemia control and greater energetic substrate availability through HK, PFK and PK actions. The nitrogen metabolism results show that WR group has a lower activity level in the deamination of glutamate. Although the WR group showed a higher mRNA HL, similar NEFA levels were found in both experimental groups. This enzyme profile concerning nitrogen and lipid metabolism can explain better performances shown by the NZ breed. Our results show that mRNA transcriptions may not be reliable indicators of respective enzyme activity. The hormone results show that apart from insulin with a role in glycemia homeostasis, T3 and IGF-1 seem to play a relevant role in the enhanced productivity in the NZ breed, with T3 intervening in the energy saving mechanisms of the restricted diet animals and IGF-1 with the known protein anabolic function.

O CBM6-1 da celulase 5B do *Cellvibrio mixtus* liga-se a glucanos de ligações β -1,3

Pires, V.M.R.¹, Prates, J.A.M.¹, Ferreira, L.M.A.¹, Gilbert, H.J.² e Fontes, C.M.G.A.¹

¹ Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

² Institute for Cell and molecular Biosciences, Newcastle University, Newcastle-Upon-Tyne, NE2 4HH, UK

As glicosídeo hidrolases modulares, que atacam polissacáridos estruturais, possuem módulos não catalíticos de ligação a hidratos de carbono (CBMs) que desempenham uma função crucial na acção destas enzimas por possibilitarem um contacto prolongado da enzima com o substrato. Os CBMs são classificados em famílias baseadas na semelhança da sua sequência primária, podendo-se encontrar descritas 52 famílias. Embora as especificidades de ligação não sejam necessariamente idênticas, os membros de cada família apresentam uma organização estrutural comum. A família 6 dos CBMs (CBM6s) possui duas fendas, que se constituem como potenciais locais de reconhecimento dos ligandos. Como exemplo temos o módulo CBM6 C-terminal da celulase 5B (CmCel5B) do *Cellvibrio mixtus*, denominado CBM6-2. A estrutura tridimensional do CBM6-2 apresenta uma arquitectura em beta-sanduíche e revelou a presença de duas fendas, designadas A e B, respectivamente. A fenda A está apta a reconhecer preferencialmente glucanos beta-1,3 enquanto que a fenda B reconhece especificamente glucanos de ligações mistas beta-1,4-1,3. A CmCel5B é uma enzima modular, possuindo um módulo catalítico na extremidade N- da família GH5, separado por uma região rica em glicinas de dois CBMs da família 6 localizados na extremidade C-, designados de CBM6-1 e CBM6-2. Este trabalho teve como objectivo a caracterização bioquímica do CBM6-1 do *C. mixtus* CmCel5B, que apresenta uma organização estrutural e especificidade aos ligandos idêntica à CBM6-2, embora mostre uma menor afinidade de ligação aos hidratos de carbono. Assim, neste contexto, a função do CBM6-1 pertencente a uma enzima modular que possui dois diferentes domínios de ligação a hidratos de carbono e quatro possíveis locais de ligação será discutida.

[CBM6-1 of *Cellvibrio mixtus* cellulase 5B binds to beta-1,3-glucans]

Modular glycoside hydrolases that attack recalcitrant polymers generally contain noncatalytic carbohydrate-binding modules (CBMs), which play a critical role in the action of these enzymes by directing the appended catalytic domains onto the surface of their substrates. Currently known carbohydrate-binding modules (CBMs) have been assigned into 52 different families. Members of each family display a common structural organisation although their ligand specificities are not necessarily identical. Family 6 CBMs (CBM6s) have distinct structural properties in that some members of this family present multiple distinct binding sites. On such example is the C-terminal CBM6 module, termed CBM6-2, of cellulase 5B (CmCel5B) from *Cellvibrio mixtus*. The structure of CBM6-2 revealed the presence of two relatively deep clefts, in the beta-sandwich structure, which were termed cleft A and cleft B. Cleft A was shown to bind preferentially laminarin while cleft B specifically recognizes beta-1,4-1,3-mixed linked glucans. CmCel5B is a modular cellulase containing an N-terminal family 5 glycoside hydrolase (GH) catalytic domain followed by an internal CBM6, termed CBM6-1, and CBM6-2. Here we report the biochemical characterization of CBM6-1 from *C. mixtus* CmCel5B, which displays a cleft organization and ligand specificity that mimics CBM6-2, although presenting lower carbohydrate binding affinities. The role of CBM6-1 in the context of a modular cellulase containing two different carbohydrate binding domains and four ligand binding clefts will be discussed.

Doseamento de EPO no humor vítreo e plasma de coelho pelo método ELISA após administração por via subconjuntival e intravítrea - resultados preliminares

Resende, A.P.¹, Delgado, E.¹, São-Braz, B.¹, Sousa-Ramalho, P.²

1 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV - TULisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa
2 Oftalmologia, Genética, Faculdade de Medicina de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa

Introdução: Estudos recentes demonstram que a Eritropoietina (EPO), para além do seu conhecido efeito eritropoiético, tem acção neuroprotectora e neuroregenerativa sobre as células ganglionares da retina (RGC), sendo actualmente considerada um promissor agente terapêutico nas doenças isquémicas retinianas. A morte das RGC resulta numa progressiva perda de visão, ocorrendo tanto no glaucoma como noutras doenças oculares causadas por hipóxia e isquémia.

Estudos prévios utilizam a via de administração sistémica ou a via intravítrea para atingirem concentrações terapêuticas ao nível da retina, ambas pouco exequíveis na prática clínica. Pretende-se estudar outra via de administração de EPO a nível ocular que demonstre eficácia, seja minimamente invasiva e que apresente uma baixa taxa de complicações na prática clínica. Este trabalho é um estudo preliminar que tem por objectivos avaliar a eficácia da via subconjuntival para administração de EPO ocular.

Materiais e métodos: Foram utilizados coelhos albinos Nova Zelândia, aos quais foi realizado um exame oftalmológico completo em ambos os olhos antes e após as administrações. Nos 15 dias após a administração monitorizou-se a evolução de eventuais complicações. Os procedimentos (punções vítreas, administração intravítrea e subconjuntival) foram realizados sob anestesia geral. Pela via intra-vítrea (injecção caudal ao limbo esclero-corneano) foram administradas 50 UI de EPO em 100 µl solução salina 0,9%. Pela via sub-conjuntival foram administradas 100 UI de EPO em 100 µl solução salina 0,9%.

Os olhos contralaterais de cada animal serviram como controlo. A EPO foi quantificada, no vítreo e no plasma dos animais, por método de ELISA (ROCHE).

Resultados: Após administração intravítrea (uma hora) obteve-se uma concentração de EPO de 107,1 mUI/ml em 100 µl de amostra colhida no vítreo. A absorção sistémica de EPO administrada por esta via mostrou ser muito baixa.

Após administração subconjuntival, obteve-se uma concentração de 0,2 mUI/ml de EPO em 100 µl de amostra colhida no vítreo. A administração de EPO pela via subconjuntival permite uma absorção sistémica no coelho que atinge a concentração máxima até às 24 horas após administração e 48 horas após a administração, a concentração plasmática de EPO retomou valores fisiológicos. Em ambos os olhos controlo não foram determinadas concentrações mensuráveis de EPO.

Conclusões: Neste estudo a via subconjuntival mostrou ser uma via possível para administração de EPO. No entanto mais estudos são necessárias para determinar a cinética sanguínea e intravítrea da EPO após administração por esta via.

O método ELISA (ROCHE) mostrou ser um método eficaz para dosear a EPO no humor vítreo de coelho, para trabalhos subsequentes.

[Plasmatic and intravitreal levels of EPO measured by the ELISA method after subconjunctival and intravitreal administration in the rabbit - preliminary results]

Introduction: Recently Erythropoietin (EPO) had been shown to have a neuroprotective and neuroregenerative effects on retinal ganglion cells (RGCs), independent from its erythropoietic properties. For this reason EPO is actually considered a promissory therapeutic agent on ischemic retinal diseases. The death of RGCs, which results in the progressive loss of visual function, occurs in glaucoma and other ocular diseases caused by hypoxia and ischemia.

All the previous studies used the systemic or intravitreal administration to acquire therapeutic concentrations on the retina, both difficult to use in clinical practice. The goal is to study another route of administration of EPO to the eye that shows efficiency and is minimally invasive while presenting a low tax of complications in clinical practice.

With the present study we pretend to evaluate the efficacy of the subconjunctival delivery method of ocular EPO.

Materials and methods: Albino New Zealand rabbits were used, to which a complete ophthalmic examination was carried out in both eyes before and after the administrations. The evolution of eventual complications was monitored during 15 days. The proceedings (intravitreal punch, intravitreal and subconjunctival administrations) were carried out under general anaesthesia. Through the intravitreal route (injection 2 mm caudal to the limbus) 50 UI of EPO diluted in 100 µl saline solution 0,9% was administered. Through the subconjunctival route 100 UI of EPO diluted in 100 µl saline solution 0,9% was administered. The opposite eyes of each animal served as control. The vitreous and plasmatic concentration of EPO was measured using the ELISA method (ROCHE).

Results: One hour after intravitreal administration, 107,1 mUI/ml of EPO was dosed in 100 µl of vitreous sample. The systemic absorption of EPO delivered by this route showed to be very low. One hour after subconjunctival administration, 0,2 mUI/ml of EPO was quantified in 100 µl of vitreous sample. Administration of EPO through the subconjunctival route allows a systemic absorption in the rabbit that reaches the highest concentration up to 24 hours after administration, and 48 hours after the administration the plasmatic concentration of EPO regained physiologic values. On both control eyes EPO was not detected.

Conclusions: In this study, the subconjunctival route proved to be an alternative for ocular administration of EPO. However further studies are necessary to assess the blood and intravitreal kinetic of EPO after subconjunctival administration.

The ELISA technique (Roche) showed to be an efficient method to quantify EPO in the vitreous humor of rabbit for subsequent studies.

Ocorrência de dermatofitoses por *Trichophyton mentagrophytes* em cuniculturas do Norte de Portugal

Moreira, F., Miranda, A., Coelho, A.C.^{1,2}, Pires, M.A.^{1,2}, Pinto, M.L.¹, Coelho, A.M.³, Monteiro, J.M., Rodrigues, J.^{1,2}

1 Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 202, 5001-911 Vila Real Codex

2 CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, accoelho@utad.pt

3 Direcção de Serviços Veterinários da Região Norte, Divisão de Intervenção Veterinária de Vila Real – Núcleo do Corgo, Lugar de Codeçais, 5000-421 Vila Real

Os dermatófitos são fungos que têm capacidade de invasão dos tecidos queratinizados de seres humanos e outros animais, originando uma infecção denominada de dermatofitose. As dermatofitoses ou tinhas são zoonoses com grande importância em Saúde Pública. Causam perdas económicas significativas em todo o mundo. Neste estudo foi efectuada a pesquisa e identificação de dermatófitos em coelhos com lesões compatíveis com dermatofitose no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, entre Agosto e Outubro de 2008. Foram analisadas 53 amostras de pêlos e descamações cutâneas provenientes de animais. As amostras foram submetidas a exame microscópico directo e cultura fúngica. Das 53 amostras cultivadas, 37 (69,8%) tiveram resultado positivo. A única espécie isolada foi *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. O potencial zoonótico das espécie isolada deve ser tomado em consideração na epidemiologia das dermatofitoses humanas da região.

[Occurrence of dermatophytosis by *Trichophyton mentagrophytes* in industrial rabbitry in the North of Portugal]

Dermatophytoses are superficial infections of the skin and adnexa caused by keratinophilic fungi, dermatophytes and represent a common concern in the production of rabbits. Dermatophyte infection or ringworm is a zoonosis with a great impact in Public Health. During a period from August to October 2008, dermatophytes were isolated and identified from rabbit sample submitted for mycological examination, in the Laboratory of Microbiology in the University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. All samples were collected from suspected clinical cases. Dermatophytes were cultured from 37 out of 53 (69.8%) specimens. The only dermatophyte isolated was *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. Zoonotic potential of this isolate need to be consider in the epidemiology of human dermatophytosis in the region.

Diagnóstico da doença hemorrágica vírica dos coelhos em articulação com a caracterização genética de isolados de campo Portugueses

Duarte, M., Fagulha, T., Ramos, F., Barros, S.C., Henriques, M., Luís, T., Cruz, B. e Fevereiro, M.

INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

Os métodos moleculares de diagnóstico são extremamente úteis dada a sua especificidade e celeridade.

Por essa razão em 2004, no que concerne ao diagnóstico do vírus da Doença Hemorrágica dos Coelho (VDHC), substituímos o método ELISA Antigénio (LNIV) utilizado no nosso laboratório desde 1989, pela técnica de RT-PCR. O método escolhido (Kok-Mun Tham *et al.*, 1999) amplifica duas regiões de 340 e 386 pb localizadas respectivamente a jusante a montante do gene *VP60*.

De acordo com as sequências actualmente disponíveis nas bases de dados, a maioria submetida nos dois últimos anos, ocorre variação nucleotídica no gene *VP60* num número significativo de isolados originários de diferentes países.

Para avaliar se a variabilidade observada pode afectar a detecção de isolados Portugueses por métodos moleculares, foi efectuado um estudo comparativo envolvendo quatro sistemas de RT-PCR diferentes (Kok-Mun Tham *et al.*, 1999; G. Le Gall *et al.*, 2003; K.Matriz *et al.*, 2006).

Os oito primers utilizados reconhecem regiões diferentes no gene *VP60*. Neste trabalho foi utilizado RNA total extraído de amostras suspeitas de VDHC entregues no Laboratório provenientes do Continente, Açores e Madeira, desde 2004 a Outubro de 2008.

Os resultados obtidos revelaram uma total concordância entre os quatro RT-PCRs utilizados indicando que, caso existam mutações nas sequências alvo dos primers, estas não afectaram a amplificação em nenhum dos métodos. Estes dados demonstram também que dois RT-PCRs utilizados para detecção de VDHC são adequados ao diagnóstico de rotina.

Para analisar a variabilidade do gene *VP60*, e consequentemente a variabilidade nas regiões alvo dos primers utilizados neste estudo, o gene *VP60* de isolados nacionais obtidos em anos diferentes, foi integralmente amplificado. Para tal, foram utilizados dois primers localizados externamente ao gene, cuja selecção se baseou no alinhamento de sequências actualmente disponíveis. Os produtos desta amplificação com cerca de 2100 pb foram clonados em pCR2.1 e sequenciados.

Reportamos os primeiros resultados da caracterização genética de isolados de campo do VDHC que circulam em Portugal nos últimos 4 anos. A análise das sequências nucleotídicas de um número mais alargado de isolados Portugueses irá permitir o aperfeiçoamento do RT-PCR utilizado no diagnóstico.

[Diagnosis of rabbit haemorrhagic disease in relation to the genetic characterization of isolates circulating in Portugal]

Molecular diagnostic methods are extremely useful for an accurate and timely diagnosis.

For this reason an in house ELISA for Rabbit Haemorrhagic Disease antigen detection used in our laboratory from 1989 to 2004, was replaced by RT-PCR. The chosen method (Kok-Mun Tham *et al.*, 1999) amplifies two regions of 340 and 386 bp located respectively upstream and within the *VP60* encoding gene.

According to the RHDV sequences presently available in the database, most of them submitted in the last two years, there is nucleotide variation in the *VP60* gene in a significant number of RHDV isolates originated from different countries.

To evaluate if the observed variation could affect the detection of Portuguese RHDV isolates by molecular methods, a comparative study was carried out involving four different RT-PCR systems (Kok-Mun Tham *et al.*, 1999; G. Le Gall *et al.*, 2003; K.Matriz *et al.*, 2006). The primers target different regions on the *VP60* gene. RNA extracted from samples suspected of RHDV that arrived to our laboratory from Mainland Portugal, Azores and Madeira Islands since 2004 to October 2008 were used.

The study showed a full agreement between the four RT-PCRs used, which indicates that presumable nucleotide variation in the Portuguese isolates is not affecting any of the methods in particular, proving that the RT-PCRs used in our laboratory are suitable for RHDV detection.

To analyse the variability of the *VP60* gene, hence the variability of the primers target regions, two primers located upstream and downstream the coding sequence of gene *VP60* were used to amplify the complete *VP60* gene of RHDV isolates collected in different years. These primers were selected during this study based on the alignment of nucleotide sequences available in the database. The amplicons of about 2100bp were cloned into pCR2.1 vector and sequenced.

We are reporting here the first results on the genetic characterisation of the RHDV isolates circulating in Portugal in the last 4 years.

The sequencing analysis of large number of Portuguese RHDV isolates will allow the tuning of the molecular method.

Desenvolvimento de um método DIVA baseado na detecção de anticorpos para a proteína não-estrutural (NS3) do vírus da Língua Azul (BTV)

Barros, S.C., Cruz, B., Luís, T.M., Ramos, F., Fagulha, T., Duarte, M., Henriques, M. e Fevereiro, M.

INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa

A vacinação é o meio mais eficaz de proteger os animais contra o BTV e reduzir a propagação do vírus após infecção. Existem comercialmente disponíveis na União Europeia vacinas inactivadas contra os serótipos de BTV 1, 2, 4 e 8, as quais têm sido preferencialmente utilizadas em substituição das vacinas vivas atenuadas convencionais.

Esta preferência baseia-se no facto das vacinas inactivadas serem mais seguras pela inexistência de replicação viral.

No entanto, a vacinação interfere com a detecção serológica de animais infectados. De modo a ultrapassar esta evidência, desenvolvemos um teste serológico DIVA baseado na resposta imunológica diferencial para a proteína não-estrutural 3 (NS3) do BTV, que possibilita a distinção entre animais vacinados e infectados. A proteína NS3 é sintetizada em grandes quantidades na célula infectada, mas não é encapsidada no virião, não fazendo portanto parte da estrutura do vírus. Teoricamente, uma vez que as vacinas inactivadas contêm essencialmente vírus purificado, o sistema imunitário dos animais vacinados não deverá ser estimulado a produzir anticorpos contra a proteína NS3 enquanto que animais infectados, em que tenha ocorrido replicação viral, os anticorpos NS3 estão presentes.

O gene que codifica a proteína NS3 do isolado BTV4/22045/PT04 foi clonado no vector pET-28a e expresso na estirpe JM109 de Escherichia coli. A proteína NS3 recombinante obtida foi usada como antígeno num teste ELISA indirecto (NS3-ELISA) para detecção de anticorpos NS3 em soros de ruminantes. Para tal, oito soros de bovinos envolvidos num ensaio de vacinação com a vacina inactivada bivalente BTV 2-4 (Merial) foram utilizados. Nenhum dos animais vacinados desenvolveu anticorpos específicos para a NS3 antes do desafio com o vírus BTV4/22045/PT04 e com excepção de um animal em que ocorreu uma seroconversão transiente depois do desafio, os restantes permaneceram negativos durante todo o ensaio. Estes animais estavam imunizados contra o BTV uma vez que anticorpos para a proteína VP7 e anticorpos neutralizantes foram detectados. Em relação ao animal controlo não vacinado este desenvolveu anticorpos NS3 após inoculação com o vírus BTV4/22045/PT04.

De modo a avaliar a aplicabilidade da NS3-ELISA à situação de campo, 562 soros colhidos de animais vacinados, não-infectados e de animais infectados com BTV-1 ou com BTV-4 foram testados. Os resultados obtidos mostram que os animais vacinados não desenvolvem anticorpos NS3 enquanto que os animais infectados com BTV possuem elevados níveis de anticorpos. Este teste permite a diferenciação serológica entre animais vacinados e animais infectados.

[A DIVA system based on the detection of antibodies to nonstructural protein 3 (NS3) of Bluetongue virus]

Vaccination is the most effective mean to protect animals against Bluetongue virus (BTV) and to reduce the spread of virus after infection. Inactivated vaccines against serotypes 1, 2, 4, and 8 of BTV were recently developed and have been used in the European Union, replacing the conventional live attenuated vaccines. These vaccines offer significant advantages over attenuated vaccines because of the absence of replicating virus. However, vaccination interferes with the serological detection of infected animals. To overcome this problem we developed a DIVA test (differentiate infected from vaccinated animals) that looks at a differential immune response to the BTV nonstructural protein 3 (NS3). The nonstructural NS3 protein is produced in large quantities in infected cells, but is not packaged in the virion. Since inactivated vaccines for BTV are primarily made with whole virions, a differential antibody response should be observed between naturally infected and vaccinated animals. Therefore, NS3 antibody response is related in vivo to the virus activity.

The NS3 encoding gene of strain BTV4/22045/PT04 was inserted into expression vector pET-28a and expressed in Escherichia coli strain JM109. Recombinant NS3 protein was used as an antigen in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NS3-ELISA) to measure the serologic response to NS3 protein in cattle and sheep. Following a vaccination/challenge experiment, with a bivalent inactivated BTV 2-4 vaccine (Merial), seven vaccinated and one unvaccinated control bovine were evaluated for the ability to develop antibodies to NS3. All vaccinated animals were negative by NS3-ELISA and, with exception of one, remained negative even after challenge with BTV4/22045/PT04 while control animal developed NS3 in response to challenge infection. All animals developed VP7 and neutralizing antibodies.

Identificação de dois vírus da doença do bico e das penas em Papagaios Cinzentos Africanos e sua relação com outros circovírus

Henriques, A.M., Duarte, M., Fagulha, T., Ramos, F., Barros, S., Cruz, B., Luís, T., Lapão, N., Fernandes, T., Bernardino, R., Fevereiro, M.

INRB IP, LNIV, Estrada de Benfica, 701, 1549-011 Lisboa
Jardim Zoológico de Lisboa

O vírus da Doença do Bico e Penas (BFDV) está incluído no género *Circovirus* da família *Circoviridae*. O BFDV foi detectado em papagaios cinzentos Africanos do Jardim Zoológico de Lisboa e em pequenas explorações de criadores desta espécie localizadas nos arredores de Lisboa. A sequência genómica de dois BFDV nacionais (BFDV-PT05 e BFDV-PT08) foi totalmente determinada e analisada. Estas duas estirpes apresentam a estrutura genómica típica dos circovírus que consiste numa região intergenica flanqueada por duas grelhas de leitura (ORFs) de sentido oposto. Foram identificadas três outras grelhas de leitura correspondentes às ORFs 3, 5 e 6.

As proteínas codificadas pela ORF 5 das duas estirpes nacionais são truncadas no terminal amina devido à presença de códons stop precoces, o que origina a perda de 75 ou 133 amino ácidos, respectivamente no BFDV-PT05 e BFDV-PT08, quando comparadas com as proteínas homólogas dos BFDVs actualmente conhecidos. As ORFs 4 e 7 descritas noutras estirpes, estão ausentes no BFDV-PT05 e BFDV-PT08. A variabilidade genética entre BFDV-PT05 e BFDV-PT08 é de 8%. A distância genética entre os dois BFDV nacionais para as vinte e sete estirpes internacionais incluídas neste estudo variou entre 5% e 12%. A análise filogenética baseada no genoma completo dos isolados nacionais e de outras estirpes referenciadas internacionalmente revelou a existência de nove linhas genotípicas de BFDV. O BFDV-PT05 e três outras estirpes, CAT10-ZA e AFG3-ZA oriundas da África do Sul e PEP01 uma estirpe Portuguesa referenciada nos EUA, formam o grupo IV, enquanto que o BFDV-PT08 juntamente com a estirpe Alemã PEG07 e Inglesa PEU01 constituem uma nova linha genotípica.

[Two African Grey Parrot BFDV strains detected in Portugal and their relationship with other circoviruses]

Beak and Feather Disease Virus (BFDV), a member of the genus *Circovirus*, was detected in two dead grey parrots of Lisbon Zoo (BFDV-PT05) and in a small grey parrot's breeders near Lisbon (BFDV-PT08). The complete nucleotide sequences of these two Portuguese BFDVs were determined and analysed. The characteristic genomic structure of circoviruses with an intergenic region flanked by two head-to-head arranged open reading frames (ORFs) was detected. Three more ORFs were identified, corresponding to ORFs 3, 5 and 6 described in BFDVs. ORF 5 of BFDV-PT05 and BFDV-PT08 differ from the usual due to the presence of early stop codons. As a result, both strains encode proteins truncated in the N-Terminal by 75 and 133 amino acids, respectively. ORF 4 and ORF 7 described in other BFDVs are absent in BFDV-PT05 and BFDV-PT08. Phylogenetic analysis based on complete genomes of BFDV-PT05 and BFDV-PT08 and twenty seven BFDVs members found in other parts of the world revealed the existence of one new genotype lineage. BFDV-PT08 groups with two other BFDVs of grey parrots from Germany (PEG07) and from United Kingdom (PEU01) forming the new proposed genotype lineage. BFDV-PT05 together with two strains from South Africa (CAT10-ZA and AFG3-ZA) and one from Portugal (PEP01) identified in the USA, cluster in genotype lineage IV. The nucleotide sequence variation between BFDV-PT05 and BFDV-PT08 was calculated to be 8%, and it ranged from 5% to 12% when compared to that of other BFDVs found worldwide.

Índice de comunicações

SESSÕES PLENÁRIAS

EFSA: actividades de cooperação científica com os Estados Membros	2
Sérgio Potier Rodeia [EFSA: Scientific cooperation activities with Member States]	
Produtos tradicionais – Qualificação e sobrevivência.....	3
Ana Soeiro TM [Traditional products - qualification and survival]	
Lymphoma: a heterogeneous disease revealed by morphologic, immunologic and molecular investigation	5
Peter Moore	

COMUNICAÇÕES ORAIS

SUINICULTURA	10
Circovirose Suína - Resultados de vacinação em Portugal	10
Jorge, José Miguel Lopes [Porcine Circovirus - Vaccination results in Portugal]	
Estudo de prevalência de ileíte enteroproliferativa em Portugal.....	11
Mendonça, Camilo	
Carências nutricionais durante o parto	12
Barreiros, Pedro [Nutrition needs during farrow]	
Utilização de hepatoprotectores em suinicultura.....	13
Folque, Pedro [Use of hepatoprotectors in swine]	
RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS	14
Diversidad genética y base hereditaria de los caracteres de comportamiento en la raza de lidia.....	14
Cañón, Javier	
Diversidade genética em raças autóctones Portuguesas.....	15
Telo da Gama, L., Oliveira e Sousa, M.C., Santos Silva, M.F., Bressan, M.C., Carolino, M.I., Carolino, N., Ginja, C., Vicente, A. [Genetic diversity in Portuguese native breeds]	
SUSTENTABILIDADE E BEM-ESTAR EM AQUACULTURA	16
Bócio em linguado-branco (<i>Solea senegalensis</i> , kaup): a importância do maneio na produção.....	16
Ramos, P. ¹ , Peleteiro, M.C. ² , Power, D. ³ [Goiter in sole (<i>Solea senegalensis</i> , kaup): sole management importance in recirculation systems]	
A maricultura na Madeira - o presente e o seu desenvolvimento.....	17
Cruz e Silva, M.P. e Nogueira, N. [The mariculture in Madeira - the present and the future]	
Moluscicultura – uma produção animal sustentável	18
Ruano, Francisco [Molluscs aquaculture- a sustainable animal production]	

O desenvolvimento actual da aquacultura	19
Afonso, Fernando	
[The present development of aquaculture]	
EQUINOS	20
Caracterização da variação da condição corporal de éguas puro-sangue lusitano em regimes extensivos	
Fradinho, M.J. ¹ , Fernandes, R. ² , Mateus, L. ¹ , Correia, M.J. ³ , Vila-Viçosa, M.J.C. ⁴ , Ferreira-Dias, G. ¹ , Caldeira, R.M. ¹	
[Characterization of body condition changes in lusitano broodmares under extensive systems]	
Padrões de crescimento e desenvolvimento no poldro Puro-Sangue Lusitano	
Fradinho, M.J. ¹ , Fernandes, R. ² , Gomes, T. ¹ , Correia, M.J. ³ , Vila-Viçosa, M.J.C. ⁴ , Silva, M.F. ¹ , Ferreira-Dias, G. ¹ , Caldeira, R.M. ¹	
[Growth and conformation changes in the young Lusitano Horse]	
Parâmetros endócrinos de formação óssea e de puberdade em poldros de Raça Puro Sangue Lusitano	
Fradinho, M.J. ¹ , Fernandes, R. ^{1,2} , Correia, M.J. ³ , Mateus, L. ¹ , Robalo, J. ¹ , Caldeira, R.M. ¹ , Ferreira-Dias, G. ¹	
[Endocrine Parameters of Bone Formation and Puberty in Lusitano Fillies and Colts]	
REPRODUÇÃO	23
Diminuição da fertilidade das vacas leiteiras na região de Entre Douro e Minho: um problema incontornável?.....	
Rocha, António e Carvalheira, Julio	
[Decreasing fertility of dairy cows in the Entre Douro e Minho region of northern Portugal: an irreversible problem?]	
Avaliação preliminar por citometria de fluxo das alterações sazonais na qualidade do sémen após criopreservação no garanhão Lusitano	
Agrícola, R. ^{1,3} , Chaveiro, A. ¹ , Robalo Silva, J. ² , Lopes da Costa, L.F. ² , Horta, A.E.M. ³ , Moreira da Silva, F. ¹	
[Preliminary evaluation of seasonal semen freezeability from Lusitano stallions using flow-citometry]	
Maneio reprodutivo para inseminação artificial (IA) com sémen congelado: perspectivas de desenvolvimento	
Guimarães, T., Atayde, L., Rocha, A.	
[Artificial insemination (AI) with frozen semen: basic management and perspectives of development]	
Características comportamentais, dinâmica ovárica e características uterinas durante a época de transição da primavera	
Atayde, L., Rocha, A.	
[Behavioural characteristics, follicular dynamics and uterine characteristics during vernal transition in mares]	
Eficiência reprodutiva em bovinos de carne: I – Análise de parâmetros e perspectivas de selecção; II – Factores ambientais e maneio reprodutivo	
Bettencourt, C. ¹ , Carolino, N. ²	
[Reproductive efficiency in beef cattle: I – Analysis of parameters and perspectives of selection. II –Environmental factors and reproductive management]	
Efeito do ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 (<i>t10,c12</i> CLA) no perfil em ácidos gordos dos oócitos bovinos durante a maturação	
Lapa, M., Marques, C.C., Alves, S.P. ² , Vasques, M.I., Baptista, M.C., Carvalhais, I. ² , Horta, A.E.M., Bessa, R.J.B. ¹ , Pereira, R.M.	
[Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (<i>t10,c12</i> CLA) on bovine oocyte fatty acid profile during maturation]	
A utilização de sémen fresco na fertilização <i>in vitro</i> de embriões ovinos melhora a qualidade dos blastocistos na raça portuguesa Merino	
Romão, R. ¹ , Marques, C.C. ² , Baptista, M.C. ² , Vasques, M.I. ² , Barbas, J.P. ² , Horta, A.E.M. ² , Bettencourt, E. ¹ , Pereira, R.M. ²	
[<i>In vitro</i> production of ovine embryos using fresh semen can improve blastocyst quality in Portuguese Merino breed]	

Expressão do gene prion-like Doppel (<i>prnd</i>) ovino em <i>E.coli</i>	30
Pimenta, J. ^{1,2} , Dias, F. ² , Centeno, M. ² , Mesquita, P. ¹ , Marques, M.R. ³ , Batista, M. ² , Santos, I.C. ⁴ , Baptista, M.C. ¹ , Barbas, J.P. ¹ , Vasques, M.I. ¹ , Silva Pereira, M. ¹ , Santos Silva, F. ¹ , Oliveira Sousa, M.C. ¹ , Carolino, I. ¹ , Gama, L.T. ¹ , Marques, C.C. ¹ , Horta, A.E.M. ¹ , Fontes, C.M. ² , Prates, J.A. ² , Pereira, R.M. ¹	
[Ovine prion-like Doppel gene (<i>prnd</i>) expression in <i>E. coli</i>]	
Criopreservação de sêmen caprino da raça Serrana: comparação entre épocas de congelação e inseminação artificial	31
Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D., Baptista, M.C., Cavaco Gonçalves, S., Pereira, R.M., Marques, C.C., Vasques, M.I. e Horta, A.E.M.	
[Buck semen cryopreservation in Serrana breed: comparison of freezing seasons and artificial insemination]	
Diálogo endométrio-embrião na cadela: expressão de integrina $\alpha\beta 3$ no endométrio durante o ciclo éstrico e na gestação inicial.....	32
Payan-Carreira, R.	
[Embryo-maternal crosstalk in the bitch: Integrin $\alpha\beta 3$ expression in the bitch endometria and in early pregnancy]	
MICROBIOLOGIA	33
Caracterização de respostas imunitárias à infecção pelo vírus da peste suína africana (VPSA) utilizando o modelo de protecção NHV/L60.....	33
Gil, S. ¹ , Sepúlveda N. ² , Albina, E. ³ , Leitão, A. ⁴ , Martins, C. ¹	
[Characterization of immune responses against African swine fever virus (ASFV) using the NHV/L60 protection model]	
Caracterização genética parcial de isolados recentes de campo do myxoma virus	34
Muller, A. ^{1,2} , Silva, E. ^{1,2} , Abrantes, J. ³ , Esteves, P.J. ³ , Ferreira, P.G. ⁴ , Carvalheira, J.C. ^{1,3} , Nowotny, N. ⁵ , Thompson G. ^{1,2}	
[Partial genetic characterization of recent myxoma virus field isolates]	
Caracterização molecular de β -lactamases de amplo espectro em <i>Escherichia coli</i> de animais selvagens em Portugal	35
Poeta, P. ^{1,2} , Radhouani, H. ^{1,2,3,4} , Gonçalves, A. ^{1,2,3,4} , Pinto, L. ^{1,2,3,4} , Carvalho, C. ^{3,4} , Martins da Costa, P. ⁵ , Rodrigues, J. ^{1,2} , Torres, C. ⁶ , Igrejas, G. ^{3,4}	
[Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases in <i>Escherichia coli</i> of wild animals in Portugal]	
Antibiorresistência da microflora fecal de lontra (<i>Lutra lutra</i> Linnaeus, 1758) em Portugal	36
Oliveira, M. ¹ , Pedroso, N. ² , Sales-Luís, T. ² , Tavares, L. ¹ e Vilela, C.L. ¹	
[Evidence of antimicrobial resistance in Eurasian otter (<i>Lutra lutra</i> Linnaeus, 1758) fecal bacteria in Portugal]	
Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de infecções entéricas e sistémicas de animais de produção.....	37
Baptista, B. e Pomba, C.	
[Fluoroquinolones resistance mechanisms in lineages of <i>Escherichia coli</i> isolated from enteric and systemic infections of animal origin]	
Mecanismos de resistência às quinolonas em <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	38
Antunes, N.T. ^{1,3} , Poveda, J.B. ¹ , Assunção, P. ¹ , Rosales, R.S. ¹ , Tavío, M.M. ²	
[Mechanisms of fluoroquinolone resistance in <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC: target mutations and active efflux]	
QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR	39
Restauração colectiva – “cook-chill” e “cook-freeze”	39
Henriques, Ana Rita Sá	
[Cook-chill and cook-freeze methods in food service]	
Microrganismos emergentes com impacto na Saúde Pública	40
Fraqueza, Maria João	
[Emerging microorganisms with impact on Public Health]	

Antibioresistências em <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas em produtos de IV Gama	41
Delgado, V. ¹ , Gonçalves, R. ¹ e Brandão, C. ²	
[Antibioresistance in <i>Enterobacteriaceae</i> isolated in ready-to-eat salads]	
Detecção de <i>Enterobacter sakazakii</i> em fórmulas lácteas em pó: implementação da metodologia ISO/TS 22964:2006	42
Assunção, R. ¹ , Correia, C. ² , Furtado, R. ² , Santos, M. ² , Novais, M. ² , Ferreira, M. ³	
[Detection of <i>Enterobacter sakazakii</i> in powdered infant formulas: implementation of the method ISO/TS 22964:2006]	
Delineamento de processos de pasteurização em alimentos de baixa acidez refrigerados	43
Silva, F.V.M. ¹ , Gibbs, P.A. ²	
[Design of pasteurization processes for low-acid chilled foods]	
Segurança alimentar e importância epidemiológica dos procedimentos de limpeza e desinfecção a nível doméstico	44
Basto, T. ¹ , Brandão, C. ² , Marcelino, S. ¹	
[Food safety and epidemiological relevance of procedures in cleaning and disinfection at household level]	
Qualidade higiénica do leite de ovelha e relação com o estado sanitário da glândula mamária	45
Potes, M.E., Queiroga, M.C.	
[Milk quality and health status of ewes' mammary gland]	
Influência do sistema de produção e raça na qualidade nutricional da carne de cabrito	46
Quaresma, M.A.G., Pereira Silva, R., Trigo Rodrigues, I.	
[Influence of breed and production system on kid goat meat nutritional quality]	
Rastreabilidade, segurança alimentar e confiança: o caso específico da raça Barrosã	47
Mendes, M.C. ¹ , Ribeiro, V. ¹ , Brito, N.V. ²	
[Traceability, food safety and confidence: Barrosã breed]	
Efeito do sistema de produção no perfil de ácidos gordos e isómeros conjugados do ácido linoleico da carne de bovino	48
Alfaia, C.P.M. ¹ , Alves, S.P. ² , Martins, S.I.V. ¹ , Fontes, C.M.G.A. ¹ , Lemos, J.P.C. ¹ , Bessa, R.J.B. ² , Prates, J.A.M. ¹ ...	
[Effect of the feeding system on fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle]	
EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA	49
Prevalência e factores de risco para úlceras gástricas em suínos	49
Pinto, S., Lunet, N.	
[Prevalence and risk factors for gastric ulcers in swine]	
Evaluación de las medidas de bioseguridad en explotaciones porcinas	50
Simon, M., Casal, J.	
[Evaluation of biosecurity measures in swine farms]	
Análise de sobrevivência aplicada à identificação de factores de risco. Caso prático: factores associados à persistência de <i>Salmonella</i> em explorações de suínos na Dinamarca	51
Baptista, F.M. ^{1,2} , Alban, L. ³ , Ersbøll, A. ¹ , Nielsen, L.R. ¹	
[Survival analysis applied to the identification of risk factors. Practical approach: factors associated to the persistence of <i>Salmonella</i> in pig herds in Denmark]	
Identificación de factores de riesgo para enfermedades del cerdo utilizando informacion existente en la industria porcina Britanica	52
Sánchez Vázquez, M. ¹ , Smith, R. ² , Gunn, G. ¹ , Edwards, S. ³	
[Combining existing management and health data from the UK pig industry to identify risk factors for pig diseases]	
El papel de factores geográficos en el programa de erradicación de la enfermedad de Aujeszky en Cataluña (2003-2007)	53
Allepuz, A. ^{1,2} , Saez, M. ^{3,4} , Solymosi, N. ⁵ , Napp, S. ¹ , Casal, J. ^{1,2}	
[The role of geographical factors on the success of Aujeszky's disease eradication programme in a high pig density area (northeast of Spain, 2003-2007)]	

Análise de risco em bem estar animal - Experiência de diversos grupos de trabalho da EFSA.....	54
Nunes, T. [Risk Assessment of Animal Welfare - Sharing EFSA's working groups experience]	
Agregación espacial de la Leishmaniosis canina en una zona endémica del Mediterráneo.....	55
Berriatua, E. ¹ , Giménez, Font, P. ² , Manchón, M. ¹ , Ruiz de Ybañez, R. ¹ , Segovia, M. ³ , Alonso, F. ¹ [Spatial heterogeneity in canine Leishmania infantum seroprevalence in an endemic Mediterranean area]	
Estimar a distribuição espacial da probabilidade de doenças infecciosas em uma região usando modelos co-kriging	56
Martinez, M., Perez, A., Torre, A., Iglesias, I., Muñoz, M.J. [Estimating the spatial distribution of the probability of infectious diseases in a region using co-kriging models]	
Modelação da ocorrência e abundância espacial dos vectores da Língua Azul recorrendo a tecnologias de Detecção Remota e Sistemas de Informação Geográfica: comparação de metodologias	57
Martins, H., Nunes, T., Boinas, F57 [Modeling the spatial occurrence and abundance of Bluetongue vectors through the use of Remote Sensing and Geographical Information Systems technologies: comparison between methodologies]	
The effect of climate on the presence of <i>Culicoides imicola</i> in Spain	58
Vilar, M.J. ^{1,2} , Guis, H. ² , Calvete, C. ³ , Lucientes, J. ⁴ , Miranda, M.A. ⁵ , Baylis, M. ² [Efecto del clima sobre la presencia de <i>Culicoides imicola</i> en España]	
Control de animales importados a Cataluña desde áreas infectadas por la Lengua Azul.....	59
Rosell, R., Casal, J., Napp, S., Selga, I., Alba, A., Molleda, M., Penedes, J., Domingo, M. [Control of animals imported to Catalonia from areas infected by Bluetongue]	
Coste de la infección por <i>Salmonella</i> en granjas de ponedoras en España	60
Napp, S., García, I., Allepuz, A., Alba, A., Casal, J. [The cost of <i>Salmonella</i> in laying hen farms in Spain]	
Estudo prévio para a implantação de um programa de controlo de reprodução em canídeos.....	61
Rodrigues, F.M. ¹ , Gartner, F. ² , Mendonça, D. ² [Prior study for the introduction of a birth control program in dogs in Portugal]	
Enfermedad de Crohn y ganadería de rumiantes. ¿Tiene lactasa?	62
Juste, R.A. [Crohn's disease and ruminant farming. Got lactase?]	
O sector leiteiro no Continente Português: desafios e oportunidades	63
Beira, S.C.R. ¹ , Mendonça, J.S.L. ¹ , Baptista, R.M.L.N. ¹ , Niza Ribeiro, J.J.R. ² [The Dairy Sector in Portugal inland: challenges and opportunities]	
Influencia del equipo de muestreo en la variación de grasa y proteína en muestras de leche bovina	64
Fouz, R. ¹ , Yus, E. ² , Sanjuán, M.L. ² , Diéguez, F.J. ^{2,3} [Influence of the sampling equipment in the variation of fat and protein in samples from bovine milk]	
PATOLOGIA.....	65
Linfoma maligno no cão em Portugal: estudo anatomopatológico e imunohistoquímico.....	65
Correia, Jorge Jesus [Canine malignant lymphoma in Portugal: anatomopathologic and immunohistochemical study]	
Estudo do potencial proliferativo e invasivo de carcinomas do endométrio em gata.....	66
Pires, M.A. ¹ , Ribas, J. ² , Augusto, C. ² , Payan-Carreira, R. ¹ [Study of invasiveness and proliferative indices in feline endometrial carcinomas]	
Tumores testiculares no coelho e no gato – estudo de três casos	67
Silva, J.F., Afonso, F., Pinho, M., Pissarra, H., Peleteiro, M.C. [Testicular tumours in the rabbit and cat - report of three cases]	

Expressão de c-kit e de MMP-9 em 38 casos de proliferação de mastócitos (mastocitoma e mastocitose) em gato.. 68 Rafael, T. ¹ , Pissarra, H. ¹ , Santos, C. ² , Carvalho, T. ³ , Correia, J. ¹ , Silva, J.F. ¹ , Afonso, F. ¹ , Peleteiro, M.C. ¹ [C-kit and MMP-9 immunoreactivity in 38 cases of mast cell proliferation (mast cell tumours/ mastocytosis) in the cat]	
Variações entre patologistas na gradação dos mastocitomas cutâneos caninos 69 Oliveira, J.P. [Variations among pathologists in histological grading of canine mast cell tumors]	
Expressão de galectina-3 em tumores mamários caninos 70 Oliveira, J.T. ^{1,2} , Gomes, J. ² , Matos, A.J. ^{1,2} , Bernardes, E. ² , Gartner, F. ^{1,2} [Galectin-3 expression in canine mammary tumours]	
Imunoexpressão da Caveolina-1 em tecidos mamários caninos 71 Amorim, I., Lopes, C.C., Gil da Costa, R.M., Faustino, A.M.R., Dias Pereira, P. [Immunoeexpression of Caveolin-1 in canine mammary tissues]	
Registo oncológico em Medicina Veterinária: sim ou não?..... 72 Pires, M.A. e Travassos, F.S. [Cancer registry in veterinary medicine. Yes or no?]	
Caracterização neuropatológica do envelhecimento nos canídeos..... 73 Lima, C. ¹ , Matos, E. ² , Gartner, F. ³ , Melo Pires, M. ⁴ [Neuropathology of ageing dogs]	
Um caso de dermatite nodular por <i>Straelensia cynotis</i> 74 Saraiva, A.L. ¹ , Leão, C. ² , Louro, M.F. ² , Ribeiro, S.P. ² , Travassos, F. ³ , Pires, M.A. ³ [Nodular dermatitis induced by <i>Straelensia cynotis</i> in a dog]	
Lymphoma classification in animals. The vision of a Pathologist in Human medicine..... 75 Cabeçadas, José	
Experiência no diagnóstico e tratamento de linfoma em cães e gatos..... 76 Montenegro, L. [Experience in diagnosis and treatment of lymphoma in dogs and cats]	
AVICULTURA..... 77	
Patologias mais frequentes em galinhas poedeiras..... 77 Grosso, Tiago Manuel Branco	
Frangos de carne: as histórias que eles nos contam 78 Sousa Nunes, José João R. [Broilers: the stories they tell us]	
OVINOTECNIA E CAPRINOTECNIA..... 79	
Influência do factor clima nos cenários epidemiológicos de doenças infecciosas nas populações de pequenos ruminantes em Portugal Continental 79 Almeida, Virgílio [Climate influences upon the epidemiological scenarios of infectious diseases on small ruminants flocks in Portugal Continental]	
Influência das alterações climáticas nos quadros epidemiológicos regionais das parasitoses dos pequenos ruminantes 80 Pereira da Fonseca, Isabel M., Madeira de Carvalho, Luis M. [Influence of climatic change in the regional epidemiological features of small ruminant parasitic diseases]	
Parasitoses de pequenos ruminantes na região da Cova da Beira 81 Lagares, A.F., Melo, R., Catarino, A.L. [Small ruminants' parasitosis in the region of Cova da Beira]	

Actualidades sobre Língua Azul	82
Boinas, Fernando	
[Actualities on Bluetongue]	
Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beira Baixa com base em tCCS	83
Barreira, A.C.R. ¹ , Águas, M.J.A.C. ² e Almeida, V. ³	
[Assessment of beira baixa ewe's milk quality based on SCC]	
Dinâmica das imunoglobulinas na defesa da glândula mamária ovina	84
Queiroga, M.C. ¹ e Vilela, C.L. ²	
[Immunoglobulin dynamics in the defense of ovine mammary gland]	
Importância do Ecossistema Montado na Sustentabilidade da Agricultura Mediterrânica	85
Potes, José Mira	
[Importance of Montado Ecosystem in the sustainability of Mediterranean Agriculture]	
Sustentabilidade da produção de ovinos em pastoreio. Contributo do Projecto Extensity.....	86
Belo, Carlos Carmona	
[Sustainability of grazing sheep production systems. A contribution of the Extensity project]	
Padrões de expressão de proteínas em tecido hepático de ovinos sujeitos a restrição alimentar: um estudo nas raças merino australiano, dorper e damara com recurso a electroforese bi-dimensional e espectrometria de massa	87
Carvalho, M.R. ^{1,2,3} , Coelho, A.V. ^{1,4} , Kilminster, T. ⁵ , Scanlon, T. ⁵ , Oldham, C. ⁵ , Greeff, J. ⁵ , Milton, J. ⁶ , Alfaro Cardoso, L. ¹ , Almeida, A.M. ^{1,2}	
[Understanding protein expression profiles in the liver of sheep subjected to weight loss: an approach using Proteomics and Mass Spectrometry methodologies in the Australian Merino, Dorper and Damara breeds]	
Parâmetros de qualidade da carcaça e da carne de pequenos ruminantes	88
Cadavez, Vasco	
[Small ruminants carcass and meat quality parameters]	
ANIMAIS DE COMPANHIA	89
Antibioterapia de infeções multiresistentes I: bactérias Gram-positivas	89
Pomba, Constança	
[Antimicrobial therapy of multiresistant infections: Gram-positive bacteria]	
Acção de neuropeptidos na regulação da circulação ocular	90
Delgado, E. ¹ , Marques-Neves, C. ² , Rocha, I. ² , Sales-Luís, J. ¹ e Silva-Carvalho, L. ²	
[Neuropeptide action on the control of ocular circulation]	
Modulação da circulação ocular por um bloqueador dos canais de cálcio.....	91
Delgado, E. ¹ , Marques-Neves, C. ² , Rocha, I. ² , Sales-Luís, J. ¹ e Silva-Carvalho, L. ²	
[Modulation of ocular circulation by a calcium channel blocker]	
Antibioterapia de infeções multiresistentes I: bactérias Gram-negativas	92
Pomba, Constança	
[Antimicrobial therapy of multiresistant infections: Gram-negative bacteria]	
Parvovírus Canino em Portugal	93
Vieira, M.J. ^{1,2} , Oliveira, J. ² , Vieira, A.L. ² , Silva, E. ¹ , Carvalheira, J. ¹ , Thompson, G. ¹	
[Canine Parvovirus in Portugal]	
Estudo da resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em isolados de <i>Escherichia coli</i> uropatogénicos de animais de companhia.....	94
Fonseca, J. e Pomba, C.	
[Study of the plasmid-mediated quinolone resistance in uropathogenic <i>Escherichia coli</i> isolates in companion animals]	

BUIATRIA	95
Patologias mais relevantes em ruminantes de extensivo.....	95
Mira, José Costa	
[Most relevant pathologies in ruminants in extensive way of production]	
Assistência veterinária em explorações de engorda intensiva. Oportunidades actuais e perspectivas	96
Vieira, Ana	
[Veterinary assistance in feedlots. Today's opportunities and perspectives]	
Biossegurança em efectivos de bovinos leiteiros	97
Bexiga, Ricardo	
[Biosecurity on bovine dairy farms]	
Infecções por <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em bovinos em Portugal: Importância clínica e epidemiológica.....	98
Mendonça, C. ^{1,2} , Almeida, A. ³ , Delgado, M.L. ³ , Castro, A. ^{2,3} , Correia da Costa, J.M. ^{2,3} , Canada, N. ¹	
[Infections by <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> in cattle from Portugal: clinical and epidemiological relevance]	
Leveduras prevalentes em mamites bovinas: caracterização fenotípica e genotípica	99
Correia, J. ¹ , Marques, S. ¹ , Silva, E. ¹ , Pena, T. ¹ , Santos, I. ² , Thompson, G. ¹	
[Prevalent yeast in bovine mastitis: phenotypic and genotypic characterization]	
Factores de risco da hiperqueratose e efeitos desta sobre a saúde do úbere.....	100
Sousa, J. ¹ , Pereira, A. ¹ , Madeira, H. ¹ , Gomes, C. ² , Niza Ribeiro, J. ^{1,2}	
[Risk factors of hyperkeratosis and its effects on udder health]	
Micoplasmose bovina na OPP de Vila do Conde: estudo sero-epidemiológico	101
Raposo, J.C. ^{1,2} , Gil, S. ² , Carneiro, C. ² , Oliveira, M. ² , Figueiredo, M.D. ¹ , Vilela, C. ²	
[Bovine mycoplasmosis in the Vila do Conde OPP: sero-epidemiologic survey]	
OUTROS ASSUNTOS DE INTERESSE EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS.....	102
Complexo Respiratório Suíno (CRS). Situação actual em Espanha.	102
Fraile, Lorenzo	
[Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Update on the Spanish situation]	
Médicos Veterinários do sector de animais de produção: Passado, Presente e Futuro	103
Raposo, J.C. ^{1,2} , Lorena, M.J. ¹ , Parente, A. ¹ , Ferreira, D. ¹ , Figueiredo, M.D. ^{1,2}	
[Livestock veterinarians: Past, Present and Future]	
O Proteoma do músculo gastrocnemius em Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) – Estabelecimento de um mapa de referência.....	104
Almeida, A.M. ^{1,2} , Campos, A. ² , Van Harten, S. ¹ , Cardoso, L.A. ¹ , Coelho, A.V. ^{2,3}	
[Establishment of a reference proteome map of the gastrocnemius muscle in the rabbit]	
As “Revoluções Agrícolas” em Inglaterra e em Portugal - evidência zooarqueológica	105
Davis, Simon J.M.	
[The “Agricultural Revolutions” in England and in Portugal - zooarchaeological evidence]	
POSTERS	
Sustentabilidade e bem-estar em aquacultura	
P1 Controlo sanitário em aquicultura portuguesa	108
Freitas, S. ¹ , Pina Fonseca, A. ¹ , Bernardo, F. ¹ , Duarte, T. ² , Martins, H.M. ² , Albuquerque, T. ²	
[Health surveillance in portuguese aquaculture]	
P2 Sustentabilidade em aquicultura portuguesa: alternativa viável	109
Freitas, S., Pina Fonseca, A., Bernardo, F.	
[Sustainability: a viable alternative in portuguese aquaculture]	

P3 O Papel do Médico Veterinário na Piscicultura.....	110
Mestre, P.M. e Afonso, F. [The Veterinary Surgeon in the fish farm]	
P4 Anisakióse: o que interessa saber!	111
Ramos, P. [Anisakiosis: what you should know!]	
P5 Anisakiódeos em pescada, carapau e sardinha provenientes das lotas de Peniche e de Setúbal.....	112
Borges, S. ¹ , Ramos, P. ² , Pereira da Fonseca, I. ¹ [Anisakids larvae in european hake, horse mackerel and sardine from harbour markets of Peniche and Setúbal]	
P6 Lesões macroscópicas em Pampo (<i>Balistes capriscus</i>) provocadas por Percebes (<i>Conchoderma virgatum</i>).....	113
Ramos, P. ¹ , Ruano, F. ¹ , Jesus, D. ² , Cruz, T. ² [Macroscopic lesions on Grey Triggerfish (<i>Balistes capriscus</i>) by pedunculate Barnacle (<i>Conchoderma virgatum</i>)]	
P7 Estudo fenotípico de multirresistência a antibióticos em isolados de <i>Escherichia coli</i> em tainha (<i>Lisa ramada</i>) proveniente do Mondego	114
Pereira, C. ¹ , Costa, D. ¹ , Álvares, S. ¹ , Coelho, A.C. ^{1,2} , Pinto, L. ^{1,2} , Pires, M.A. ^{1,2} , Carrola, J. ³ , Matos, M. ⁴ , Rodrigues, J. ^{1,2} [Phenotype of multiple antibiotic resistance in isolates of <i>Escherichia coli</i> in mullet (<i>Lisa ramada</i>) from Mondego River]	
P8 Influência da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do rio Febros na resistência a antibióticos em isolados de <i>Escherichia coli</i> em amostras fecais de peixes.....	115
Álvares, S. ¹ , Costa, D. ¹ , Pereira, C. ¹ , Coelho, A.C. ^{1,2} , Pinto, L. ^{1,2} , Pires, M.A. ^{1,2} , Carrola, J. ³ , Matos, M. ⁴ , Rodrigues, J. ^{1,2} [Influence of Residual Water Treatment Station (RWTS) of Febros River in the antibiotic resistance in isolates of <i>Escherichia coli</i> faecal fishes samples]	
P9 Evolução do perfil lipídico e índice de condição em moluscos bivalves submetidos a longos períodos de depuração	116
Ruano, F. ¹ , Ramos, P. ¹ , Quaresma, M. ² , Pereira da Fonseca, I. ² [Evolution of the lipid profile and index of condition in mollusc bivalves submitted to a long range depuration procedure]	
Equinos	
P10 Infecção parasitária dos asininos da raça de Miranda em 2005 e 2008.....	117
Sousa, S. ¹ , Rodrigues, J. ² , Silva, A. ¹ , Pimentel, M. ¹ , Madeira de Carvalho, L.M. ³ [Parasitic infection of Miranda do Douro donkey breed in 2005 and 2008]	
P11 Infecção por Estrongilídeos em asininos de Carviçais – Torre de Moncorvo.....	118
Sousa, S. ¹ , Henriques, C. ¹ , Loução, L. ¹ , Ferreira, E. ¹ , Madeira de Carvalho, L.M. ² [Strongyle infection in donkeys from northern of Portugal – Torre de Moncorvo, Carviçais]	
P12 Parasitismo gastrointestinal em explorações de equinos no Norte Alentejano: resultados preliminares	119
Baptista, A.M.L. ¹ , Gomes, L. ² , Minas, M. ¹ , Santos, R. ¹ , Gouveia, A. ¹ , Madeira de Carvalho, L.M. ² [Gastrointestinal parasitism in horse facilities of North Alentejo: Preliminary results]	
P13 Infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em cavalos	120
Gomes, J. ¹ , Rebêlo, E. ¹ , Dumler, J.S. ³ , Santos, A.S. ² [<i>Anaplasma phagocytophilum</i> infection in horses]	
P14 Modelo biomatemático determinístico (“Anthelmintic Resistance Program”) de avaliação da resistência aos anti-helmínticos dos estrongilídeos dos equídeos	121
Cernea, M. ¹ , Cernea, C.L. ¹ , Madeira de Carvalho, L.M. ² , Cozma, V. ¹ [Deterministic bio-mathematical model (“Anthelmintic Resistance Program”) of resistance evaluation in equine strongyles]	
P15 Existem “períodos ótimos” para manipular os poldros?	122
Figueiredo, I. ¹ , Costa, H. ² , Meireles, J. ¹ , Rosa, I. ¹ [Are there “optimal timeframes” for handling foal (<i>Equus caballus</i>)?]	

Reprodução

- [P16](#) Utilização de temperatura elevada e manipulação do pénis para colher sémen num garanhão com problemas de ejaculação em vaginas artificiais: caso clínico..... 123
Rocha, A.¹, Atayde, L.¹, Guimarães, T.¹, McDonell, S.²
[Use of high temperature and penis manipulation in a stallion unresponsive to standard artificial vaginas: a case report]
- [P17](#) Influência da fonte proteica e sua interação com o meio na maturação *in vitro* (IVM) de oócitos de cadela . 124
Lopes, G., Ferreira, P., Rocha, A.
[Influence of protein source and its interaction with medium on the *in vitro* maturation (IVM) of canine oocytes].....
- [P18](#) Caracterização da produção de biofilme, da expressão de celulose e de fímbrias curli por isolados de *E. coli* recuperados de úteros de vacas leiteiras com puerpério normal ou metrite clínica..... 125
Silva, E., Leitão, S., Carneiro, C., Oliveira, M., Nunes, T., Lopes da Costa, L., Mateus, L.
[Characterization of biofilm production, curli and cellulose expression by *E. coli* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis]
- [P19](#) Caracterização genómica de *E. coli* isoladas de úterus de vacas leiteiras com metrites clínica e de úterus de cadelas com piómetra..... 126
Silva, E.¹, Leitão, S.¹, Tenreiro, T.², Pomba, C.¹, Lopes da Costa, L.¹, Mateus, L.¹
[Genomic characterization of *E. coli* involved in the different outcomes of the uterine infection in the cow and in the bitch]
- [P20](#) Vitriificação de oócitos bovinos: resultados preliminares. 127
Marques, C.C., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M., Barbas, J.P., Pereira, R.M.
[Bovine oocyte vitrification: preliminar results]
- [P21](#) A qualidade dos espermatozóides epididímários (EE) de bovino à descongelação é afectada pelo tipo de diluidor 128
Soares, L., Lopes, G., Ferreira, P., Rocha, A.
[Quality of frozen/thawed bovine epididymal spermatozoa (ES) is affected by type of extender]
- [P22](#) Utilização dos parâmetros espermáticos e da fertilização *in vitro* (FIV) para prognóstico da fertilidade *in vivo* de sémen descongelado de caprino 129
Pereira, R.M.¹, Marques, C.C.¹, Barbas, J.P.¹, Baptista, M.C.¹, Poulin, N.², Vasques, M.I.¹, Mascarenhas, R.D.¹, Cognie, Y.², Cavaco-Gonçalves, S.¹, Horta, A.E.M.¹
[Sperm and *in vitro* fertilization (IVF) parameters as predictors of *in vivo* fertility of frozen thawed buck semen]
- [P23](#) Expressão das ciclo-oxigenases no endométrio da cadela durante o ciclo éstrico 130
Santos, C.¹, Santos, D.², Mateus, L.³, Pires, M.A.⁴, Payan-Carreira, R.⁴
[CycloOxygenases in the bitch endometrium at different stages of oestrous cycle]

Microbiologia

- [P24](#) Um novo sistema de clonagem para obtenção de antígenos recombinantes em fusão com a lipoproteína bacteriana OprI, um ligando de TLR 131
Basto, A.P.¹, Cunha, R.C.^{1,2}, Bastos, A.P.¹, Cartaxeiro, C.¹, Martins, C.L.¹, Leitão, A.³
[A new cloning system to obtain recombinant antigens in fusion with the bacterial lipoprotein OprI, a TLR ligand]
- [P25](#) Envolvimento das Proteínas de Membrana de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC na aderência a células epiteliais de pulmão de bovino..... 132
Correia, I.¹, Carvalho, C.² e Ferronha, M.H.¹
[Involvement of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC Membrane Proteins in the adherence to bovine lung epithelial cells]
- [P26](#) Utilidade da genotipagem pelos MIRU-VNTR em isolados Portugueses de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae* 133
Duarte, E.L.¹, Amado, A.², Botelho, A.¹
[MIRU-VNTR typing value for *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* Portuguese isolates]

P27 Detecção de <i>Prototheca zopfii</i> e <i>Prototheca wickerhamii</i> por Hibridação In Situ Fluorescente (FISH)	134
Oliveira, M. ¹ , Cuc, C. ² , Rocha Dias, F. ³ , Răpuntean, G. ² , Răpuntean, S. ² , Bexiga, R. ¹ , Vilela, C.L. ¹	
[<i>Prototheca zopfii</i> and <i>Prototheca wickerhamii</i> detection by Florescent In Situ Hybridization (FISH)]	
P28 Caracterização de estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas em leitões	135
Anastácio, S.F., Cardoso, A., Carolino, M.I., Cannas Da Silva, J.	
[Characterization of <i>Escherichia coli</i> strains isolated from piglets]	
P29 Contaminantes fúngicos das culturas de dermatófitos provenientes de animais de companhia.....	136
Almeida, I. ¹ , Martins, H. ² , Lança, A. ³ , Guerra, M. ^{1,3} e Bernardo, F. ^{3,4}	
[Cutaneous mycobiota, other than dermatophytes, found in pet]	
P30 Fungos e micotoxinas em grãos de aveia usada na alimentação animal	137
Almeida, I. ¹ , Martins, H. ² , Guerra, M. ^{1,3} e Bernardo, F. ^{3,4}	
[Fungi and mycotoxins in unprocessed oats grains for animal feed use]	
P31 Aspergilose em Pinguins do cabo em cativeiro (<i>Spheniscus demersus</i>). Estudo de caso	138
Martins, H.M. ¹ , Rebelo, E., Gomes, Waap, H., Felix, J., Monteiro, T., Carvalho, M. ¹ , Mendonça, P. ¹ , Albuquerque, P. ¹ , Themudo, T., Costa, P.	
[Aspergillosis in captive Jackass penguins (<i>Spheniscus demersus</i>) in captivity. Case report]	
P32 Análise proteómica de estirpes de <i>Escherichia coli</i> produtoras de β-lactamases de amplo espectro isoladas de gaivotas das ilhas Berlengas em Portugal	139
Pinto, L. ^{1,2,3,4} , Radhouani, H. ^{1,2,3,4} , Coelho, C. ^{1,2,3,4} , Ruiz-Larrea, F. ⁵ , Carvalho, C. ^{1,2} , Torres, C. ⁵ , Domingues, P. ⁶ , Vitorino, R. ⁶ , Poeta, P. ^{3,4} , Igrejas, G. ^{1,2}	
[Proteomic analysis applied to extended-spectrum β-lactamases <i>Escherichia coli</i> strains of yellow-legged seagulls from Berlengas islands of Portugal]	
P33 Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antibióticos em estirpes de enterococos isoladas de amostras fecais de gaivotas (<i>Larus cachinnans</i>) da reserva natural das Ilhas Berlengas em Portugal.....	140
Radhouani, H. ^{1,2,3,4} , Pinto, L. ^{1,2,3,4} , Coelho, C. ^{1,2,3,4} , Rodrigues, J. ^{2,3} , Torres, C. ⁵ , Igrejas, G. ^{3,4} , Poeta, P. ^{1,2*}	
[Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from Yellow-legged Gulls (<i>Larus cachinnans</i>) of Berlengas natural reserve in Portugal]	
P34 Actividade <i>in vitro</i> da dalbavancina frente a <i>Enterococcus</i> spp. de animais selvagens, animais de companhia, frangos e humanos em Portugal	141
Radhouani, H. ^{1,2,3,4} , Gonçalves, A. ^{1,2,3} , Sargo, R. ¹ , Igrejas, G. ^{3,4} , Poeta, P. ^{1,2*}	
[<i>In vitro</i> activity of dalbavancin against enterococci isolates from wild animals, pets, poultry and humans in Portugal]	
P35 Resistência a antimicrobianos em estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas em suínos.....	142
Anastácio, S., Cardoso, A., Cannas da Silva, J.	
[Antimicrobial resistance in <i>Escherichia coli</i> strains isolated from swine]	
P36 Caracterização genética da resistência a antibióticos em estirpes de <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica (EPEC) produtora de β-lactamases de amplo espectro obtidas de coelhos, em Portugal	143
Poeta, P. ^{1,2} , Radhouani, H. ^{1,2,3,4} , Gonçalves, A. ^{1,2,3,4} , Figueiredo, N. ^{1,2} , Pinto, L. ^{1,2,3,4} , Carvalho, C. ^{3,4} , Rodrigues, J. ^{1,2} , Igrejas, G. ^{3,4}	
[Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC) carrying Extended-Spectrum β-lactamases recovered from diarrheic rabbits in Portugal]	
P37 Resistência a antimicrobianos em estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas em <i>Gallus gallus</i>	144
Cardoso, A., Anastácio, S., Cannas da Silva, J.	
[Antimicrobial Resistance in <i>Escherichia coli</i> strains isolated from poultry]	
P38 Resistência a antimicrobianos em estirpes de campo de <i>Mycoplasma bovis</i> originárias de diversas localizações geográficas	145
Antunes, N.T. ^{1,5} , Tavío, M.M. ² , Gonçalves, R. ³ , Rifatbegovic, M. ⁴ , Assunção, P. ¹ , Rosales, R.S. ¹ , Regalla, J. ³ , Poveda, J.B. ¹	
[Antimicrobial resistance amongst <i>Mycoplasma bovis</i> field strains from different geographic origins]	

- P113** Doseamento de EPO no humor vítreo e plasma de coelho pelo método ELISA após administração por via subconjuntival e intravítrea - resultados preliminares 221
 Resende, A.P.¹, Delgado, E.¹, São-Braz, B.¹, Sousa-Ramalho, P.²
 [Plasmatic and intravitreal levels of EPO measured by the ELISA method after subconjunctival and intravitreal administration in the rabbit - preliminary results]
- P114** Ocorrência de dermatofitoses por *Trichophyton mentagrophytes* em cuniculturas do Norte de Portugal 222
 Moreira, F., Miranda, A., Coelho, A.C.^{1,2}, Pires, M.A.^{1,2}, Pinto, M.L.¹, Coelho, A.M.³, Monteiro, J.M., Rodrigues, J.^{1,2}
 [Occurrence of dermatophytosis by *Trichophyton mentagrophytes* in industrial rabbitry in the North of Portugal]
- P115** Diagnóstico da doença hemorrágica vírica dos coelhos em articulação com a caracterização genética de isolados de campo Portugueses 223
 Duarte, M., Fagulha, T., Ramos, F., Barros, S.C., Henriques, M., Luís, T., Cruz, B. e Fevereiro, M.
 [Diagnosis of rabbit haemorrhagic disease in relation to the genetic characterization of isolates circulating in Portugal]
- P116** Desenvolvimento de um método DIVA baseado na detecção de anticorpos para a proteína não-estrutural (NS3) do vírus da Língua Azul (BTV) 224
 Barros, S.C., Cruz, B., Luís, T.M., Ramos, F., Fagulha, T., Duarte, M., Henriques, M. e Fevereiro, M.
 [A DIVA system based on the detection of antibodies to nonstructural protein 3 (NS3) of Bluetongue virus]
- P117** Identificação de dois vírus da doença do bico e das penas em Papagaios Cinzentos Africanos e sua relação com outros circovírus 225
 Henriques, A.M., Duarte, M., Fagulha, T., Ramos, F., Barros, S., Cruz, B., Luís, T., Lapão, N., Fernandes, T., Bernardino, R., Fevereiro, M.
 [Two African Grey Parrot BFDV strains detected in Portugal and their relationship with other circoviruses]
- Qualidade e Segurança Alimentar
- P39** Aplicación del ATP bioluminiscencia para determinar la limpieza de equipos de ordeño 146
 Vilar, M.J.¹, Rodríguez-Otero, J.L.¹, Diéguez, F.J.^{1,2}, Sanjuán, M.L.¹, Yus, E.¹
 [Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment]
- P40** Antibioresistencias em coliformes termotolerantes isolados de tábuas de corte 147
 Santos, A.¹, Tavares, C.¹ e Brandão, C.²
 [Antibioresistance in thermotolerant coliforms obtained from chopping boards]
- P41** Actividade lipolítica de leveduras em enchidos tradicionais portugueses 148
 Almeida, I.¹, Barreto, A.S.², Matos, T.J.³
 [Lipolytic activity of yeasts in Portuguese traditional dry sausages]
- P42** Avaliação da qualidade higio – sanitária da carne de frango: pesquisa de *Listeria monocytogenes* por PCR... 149
 Caleiro, P., Fernandes, M.J., Fernandes, H., Fraqueza, M.J.
 [Poultry meat higio – sanitary evaluation: *Listeria monocytogenes* detection by PCR]
- P43** Monitorização micotoxicológica de alimentos compostos para animais produzidos em Portugal 150
 Costa, J.M.¹, Bernardo, F.¹ e Martins, H.M.²
 [Mycotoxin monitorization of portuguese compound feeds]
- P44** Pesquisa de tecido do Sistema Nervoso Central em masséteres de bovino..... 151
 Silva, J.C., Machado, C., Carvalho, R., Santos, A. e Orge, L151
 [Screening for Central Nervous System tissue in head meat]
- P45** Causas de rejeição hepática de bovinos e suas implicações económicas 152
 Marques, V.², Vala, H.¹, Monteiro, L.², Mesquita, J.¹
 [Causes for hepatic rejections in bovines in abattoirs and its economic implications]
- P46** Controlo analítico da eficácia das operações de limpeza em restauração: comparação entre métodos clássicos e rápidos..... 153
 Brandão, C.¹, Lopes, S.², Morgado, C.³, Medeiros, V.², Viegas, C.³
 [Analytic control of cleaning operations in food catering: classic and rapid methods comparison]

- [P47](#) Efeito de stresse ácido na sobrevivência de *Campylobacter jejuni*..... 154
Pires dos Santos, T.¹, Birk, T.², Nielsen, D.S.², Knøchel, S.²
[Acid stress response in *Campylobacter jejuni*]
- [P48](#) Caracterização físico-química da carne de frangos provenientes de diferentes sistemas de produção 155
Yersan, T., Brito, N.V.
[Evaluation of physicochemical characteristics of different chicken production systems]
- Epidemiologia e saúde pública
- [P49](#) Programa de Vigilância da Gripe Aviária - Resultados de 2007 e 2008 156
Tavares Santos, P., Cara D'Anjo, A., Pina Fonseca, A.
[Surveillance Program for Avian Influenza - Results from 2007 and 2008]
- [P50](#) Avaliação quantitativa do parasitismo intestinal em aves de produção 157
Monteiro, L.¹, Bica, A.², Mesquita, J.³, Marques, V.¹, Vala, H.³
[A Quantitative study on intestinal parasites in birds for human consumption]
- [P51](#) Caracterização de explorações industriais de suínos, em Portugal - resultados preliminares 158
Baptista, F.M.^{1,2}, Almeida, V.²
[Characterization of the industrial swine herds in Portugal – preliminary results]
- [P52](#) Percepción de la importancia de las medidas de bioseguridad de las granjas de porcino 159
Simon, M., García, I., Casal, J.
[Perception of importance of biosecurity measures on swine farms]
- [P53](#) Encuesta seroepidemiológica de la toxoplasmosis porcina en Cataluña 160
García, I.¹, Simon-Grifé, M.¹, Cabezón, O.¹, Martín, G.¹, Almería, S.^{1,2}
[Seroepidemiology survey of swine toxoplasmosis in Catalonia]
- [P54](#) Pesquisa de *Trichinella* sp. em suínos de algumas regiões do nordeste transmontano 161
Nóbrega, C.¹, Sousa, M.I.²
[*Trichinella* sp. in pigs of northeast Portugal]
- [P55](#) Caracterização das explorações pecuárias no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, ilha de S. Miguel, Açores 162
Lima, R.¹, Vaz, Y.²
[Characterization of farms in dairy farms in Nordeste, S.Miguel island, Azores]
- [P56](#) Seroprevalência da infecção por *Leptospira* spp. no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, São Miguel, Açores 163
Lima, R.¹, Benevides, S.², Flor, L.², Vaz, Y.³
[Evaluation of seroprevalence of Leptospirosis in dairy production system in Nordeste County of São Miguel Island, Azores]
- [P57](#) Diagnóstico serológico da *Chlamydomphila abortus* em bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, ilha de S. Miguel, Açores 164
Lima, R.¹, Benevides, S.², Flor, L.², Vaz, Y.³
[Serological Diagnosis of *Chlamydomphila abortus* in dairy production system in Nordeste county, S. Miguel Island, Azores]
- [P58](#) Estudio de seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en la cabaña bovina de Extremadura (España suroccidental) y papel del ciervo (*Cervus elaphus*) en su epidemiología 165
García, A.¹, Galán, L.², Morales, J.², Castillo, L.³, Bermejo, F.³, Hermoso de Mendoza, J.³, Gutiérrez, J.L.², Merchán, J.², Alonso, J.M.³
[Seroprevalence study of *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis in bovine population of Extremadura (South-western Spain) and role of red deer (*Cervus elaphus*) in its epidemiology]
- [P59](#) La vacunación frente a paratuberculosis con una vacuna inactivada por calor no interfiere en el diagnóstico de la tuberculosis bovina 166
Juste, R.A., Alonso, M., Molina, E., Geijo, M.V., Vazquez, P., Gomez, N., Fuertes, M., Sevilla, I., Garrido, J.M.
[Effective vaccination against paratuberculosis with a heat-killed vaccine does not compromise the diagnosis of bovine tuberculosis]

P60 Seroprevalencia de <i>Coxiella burnetii</i> en rumiantes domesticos en pastoreo semi-extensivo del norte de España	167
Astobiza, I., Ruiz-Fons, J.F., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L. [Study of the seroprevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in domestic ruminants in semi-extensive grazing system from northern Spain]	
P61 Rastreo serológico de Febre Q em ovinos no concelho de Montemor-o-Novo	168
Fernandes, A.C. ¹ , Oliveira, M. ² , Carneiro, C. ² , Manteca, C. ¹ , Vilela, C.L. ² [Serological survey of Q fever in sheep in the Montemor-o-Novo district]	
P62 Observaciones sobre los primeros focos de Lengua Azul serotipo 1 en Cataluña	169
Allepuz, A. ^{1,2} , Pujols, J. ^{1,3} , Garcia, I. ¹ , Lopez, S. ¹ , Selga, I. ⁴ , Rosell, R. ^{1,4} , Molleda, M. ⁴ , Panadès, J. ⁴ , Turó, M. ⁴ , Gou, J. ⁴ , Domingo, M. ^{1,2} [Observations on the first outbreaks of Blue Tongue serotype 1 in Catalonia]	
P63 Diferentes abordagens para o estudo dos vectores da Língua Azul pertencentes ao complexo <i>C. obsoletus</i> e <i>C. dewulfi</i> em Portugal	170
Diaz, S., Alexandre-Pires, G., Meireles, J., Boinas, F., Pereira da Fonseca, I. [Different approaches for the study of the blue tongue vectors <i>C. obsoletus</i> complex and <i>C. dewulfi</i> in Portugal]	
P64 Parasitismo em ruminantes do concelho de Coruche (Portugal).....	171
Rosa, F. ¹ , Crespo, M. ² , Mariano, P. ² , Cipriano, J.M. ³ [Parasitism in ruminants from the Coruche council (Portugal)]	
P65 Descrição dos primeiros casos de Tremor Epizoótico Clássico em Portugal, com a existência, em simultâneo, da forma Atípica no mesmo efectivo	172
Orge, L. ¹ , Oliveira, A. ² , Machado, C. ¹ , Lima, C. ¹ , Ochoa, C. ¹ , Silva, J. ¹ , Carvalho, R. ¹ , Tavares, P. ¹ , Almeida, P. ¹ , Ramos, M. ¹ e Pinto, M.J. ² [First Report of Classical Scrapie in Portugal, including co-existence with atypical scrapie in the same flock]	
P66 Estudio longitudinal de la eliminación fecal de <i>Escherichia coli</i> verotoxigénicos en el ganado ovino: detección de clones persistentes en las explotaciones	173
Sánchez, S. ¹ , Martínez, R. ¹ , García, A. ² , Blanco, J. ³ , Blanco, J.E. ³ , Blanco, M. ³ , Dahbi, G. ³ , López, C. ³ , Mora, A. ³ , Rey, J. ¹ , Alonso, J.M. ¹ [Longitudinal study of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> fecal shedding in sheep: persistence of specific clones on sheep flocks]	
P67 Seroprevalencia de la Enfermedad de la Frontera (Border Disease) en ganado ovino	174
Maldonado, A. ¹ , Tarradas, C. ¹ , Astorga, R. ¹ , Huerta, B. ¹ , Gómez-Pacheco, J.M. ² , Segado, F. ¹ , Gómez, J.M. ³ , Luque, I. ¹ [Seroprevalence of Border Disease in ovine flocks]	
P68 Estado inmune humoral frente al virus del moquillo canino, parvovirus canino y leptospiras en un criadero canino de Mastin del Pirineo tras la vacunación	175
Simón, M.C. ¹ , Ortega, C. ¹ , Saldivia, C. ² , Alonso, J. ¹ [Humoral immune status against canine distemper virus, canine parvovirus and leptospiras in a breeding kennel of Pyrenean Mastif after vaccination]	
P69 Factores de riesgo de la infección por agentes del género <i>Campylobacter</i> spp. en perros procedentes de clínicas en Córdoba (España).....	176
Carbonero, A. ¹ , Arenas, A. ¹ , Campos, E. ² , Huerta, B. ¹ , Borge, C. ¹ , García, I. ¹ , Torralbo, A. ¹ , Perea, A. ¹ [Risk factors for infection by <i>Campylobacter</i> spp. in dogs from clinics from Cordoba (Spain)]	
P70 Estudio Epidemiológico de la Ehrlichiosis y Enfermedad de Lyme en perros de la provincia de Cádiz (España)	177
Tarradas, C. ¹ , González, M. ¹ , Maldonado, A. ¹ , Carbonero, A. ¹ , Astorga, R. ¹ , Vilaplana, F. ² , Borge, C. ¹ , Luque, I. ¹ [Epidemiological survey of Ehrlichiosis and Lyme Disease in dogs in Cadiz province (Spain)]	
P71 Estudio epidemiológico de la Hepatitis E en perros de la provincia de Cádiz (España).....	178
Luque, I. ¹ , González, M. ¹ , Peralta, B. ² , Mateu, E. ² , Maldonado, A. ¹ , Carbonero, A. ¹ , Vilaplana, F. ³ , Tarradas, C. ¹ [Epidemiological survey of Hepatitis E in dogs in Cadiz province (Spain)]	

P72 Resistencia a antibióticos en microorganismos ubícuos de perros de compañía; ¿existe riesgo de transmisión de la resistencia al hombre?.....	179
Ortega, C., Simón, M.C., Alonso, J.L., Gimeno, O.	
[Antibiotic resistance in microorganims isolated in companion dogs; does it exist risk of resistance transmission to the men?]	
P73 Aproximación al riesgo de transmisión de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos en poblaciones cunícolas	180
Ortega, C., Simón, M.C., Alonso, J.L., Gimeno, O.	
[Risk of transmission of resistant to antibiotics <i>E. coli</i> strains in rabbit populations]	
P74 Factores de riesgo asociados a la enfermedad hemorrágica del conejo en poblaciones de conejo silvestre (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) en Andalucía.....	181
García I. ¹ , Astorga, R.J. ² , Napp, S. ¹ , Huerta, B. ² , Carbonero, A. ² , Arenas, A. ²	
[Study of risk factors associated to wild rabbit haemorrhagic disease in wild rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) populations from Andalusia]	
P75 Identificação de helmintes no coelho bravo.....	182
Coelho, C., Nóbrega, C., Vala, H.	
[Helminthe identification in wild rabbit]	
P76 Agentes infecciosos encontrados em pombos da cidade de Lisboa	183
Martins, H.M. ¹ , Rebêlo, E. ¹ , Gomes, J. ¹ , Waap, H. ¹ , Felix, T. ¹ , Monteiro, M. ¹ , Carvalho, P. ¹ , Mendonça, P. ¹ , Albuquerque, T. ¹ , Themudo, P. ¹ , Costa Gomes, L. ²	
[Infectious agents found in pigeons of the city of Lisbon]	
P77 Rastreo virológico de Carnívoros em Moura Barrancos Natura 2000, SE Portugal	184
Maldonado, C. ¹ , Duarte, A. ² , Leitão, I. ¹ , Ferreira, J.P. ¹ , Santos-Reis, M. ¹ , Tavares, L. ²	
[Virological survey of carnivores in Moura Barrancos Natura 2000 Site, SE Portugal]	
P78 Efeitos colaterais das batidas aos javalis.....	185
Mouro, S., Oliveira, M., Vilela, C.L., Niza, M.M.G.R.E	
[Side effects of wild-boar hunting]	
 Patologia	
P79 Melanoma labial numa Juliana (<i>Pollachius pollachius</i>)	186
Marques Pereira, N. ^{1,2} , Faísca, P. ¹	
[Labial melanoma in a Pollack (<i>Pollachius pollachius</i>)]	
P80 Carcinoma micropapilar invasor da glândula mamária canina e felina: uma entidade sub-diagnosticada?.....	187
Gama, A. ¹ , Seixas, F. ¹ , Alves, A. ¹ , Pires, M.A. ¹ , Lopes, C. ^{2,3} , Schmitt, F. ^{4,5}	
[Invasive micropapillary carcinoma of canine and feline mammary gland: an under recognized entity?]	
P81 Tumor filóide da mama da cadela e da gata.....	188
Seixas, F. ¹ , Gama, A. ¹ , Pires, M.A. ¹ , Alves, A. ¹ , Schmitt, F. ^{2,3} , Lopes, C. ^{4,5}	
[Phyllodes tumour of the canine and feline mammary gland]	
P82 Cistadenoma ovárico bilateral em burras.....	189
Quaresma, M. ¹ , Pires, M.A. ² e Payan-Carreira, R. ²	
[Bilateral cystadenoma in donkey ovaries]	
983 Vacuolização disseminada das células glandulares prostáticas do cão – a propósito de um caso.....	190
Silva, J.F.	
[Disseminated vacuolization of canine prostatic glandular cells - report of a case]	
P84 Um caso de carcinoma gástrico com metaplasia óssea num cão	191
Amorim, I. ¹ , Gärtner, M.F. ² , Faustino, A.M.R. ¹ , Gil da Costa, R.M. ¹ , Dias Pereira, P. ¹	
[A case of gastric carcinoma with osseous metaplasia in a dog]	

- [P85](#) As células Mato retinianas acumulam ferritina e podem desempenhar um papel central na homeostasia do ferro 192
 Mendes-Jorge, L.¹, Ramos, D.², Luppó, M.^{2,3}, Llombart, C.^{2,3}, Alexandre-Pires, G.¹, Nacher, V.^{2,3,7}, Melgarejo, V.²,
 Correia, M.⁵, Navarro, M.^{2,3,7}, Carretero, A.^{2,3,7}, Tafuro, S.^{2,7}, Rodriguez-Baeza, A.⁶, Bosch, F.^{2,4,7}, Esperança-Pina,
 J.A.⁵ e Ruberte, J.^{2,3,7}
 [Retinal Mato cells can store ferritin and may have a central role in iron homeostasis]
- [P86](#) Estudo metabólico e histopatológico das lesões renais observadas em ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF), um
 modelo experimental de Diabetes Tipo 2 193
 Teixeira de Lemos, E.^{1,2}, Vala, H.^{1,3}, Reis, F.², Baptista, S.², Piloto, N.², Garrido, P.², Carvalho, L.⁴, Teixeira, F.²
 [Metabolic evolution and histopathological renal changes in Zucker Diabetic Fatty (ZDF)rats: an experimental
 model of type 2 diabetes]
- [P86B](#) Um estudo do conteúdo de ADN por citometria de imagem no histiocitoma cutâneo canino 194
 Pires, I.¹, Alves, A.¹, Palmeira, C.^{2,3}, Silva, F.¹, Lopes, C.⁴
 [DNA image cytometry study in Canine Cutaneous Histiocytoma]
- Animais de Companhia
- [P87](#) *Giardia* spp.: determinação da frequência de infecção em cães e gatos do distrito de Évora 195
 Baltasar, P., Vila-Viçosa, M., Padre, L., Lima, S., Vilhena, M.
 [*Giardia* spp.: determination of the frequency of infection in dogs and cats from the district of Évora]
- [P88](#) Infecções parasitárias com carácter zoonótico em cães e gatos errantes do Concelho de Coimbra 196
 Sousa, S.¹, Rosa, C.¹, Mateus, F.¹, Portugal, M.², Antunes, N.¹, Madeira de Carvalho, L.M.²
 [Zoonotic parasitic infections in street dogs and cats from Coimbra Council]
- [P89](#) Dirofilariose canina no distrito de Coimbra 197
 Sousa, S.¹, Pimentel, M.¹, Silva, A.¹, Madeira de Carvalho, L.²
 [Canine Dirofilariosis in Coimbra district]
- [P90](#) Leishmaniose canina no distrito de Coimbra 198
 Sousa, S.¹, Blanco, A.S.¹, Teixeira, L.¹, Madeira de Carvalho, L.²
 [Canine leishmaniosis in Coimbra district]
- [P91](#) Expressão de citocinas em tecidos de cães infectados com *Leishmania infantum lchagasi* e em cães tratados
 199
 Alexandre-Pires, G.¹, Barbosa, M.A.G.², Soares-Clemente, M.³, Marques, C.³, Rodrigues, O.R.³, Villa de Brito, T.¹,
 Pereira da Fonseca, I.¹, Alves, L.C.², Santos-Gomes, G.M.³
 [Cytokine expression in tissues of dogs infected with *Leishmania infantum lchagasi* and after treatment]
- [P92](#) Oncocercose ocular num cão em Portugal 200
 Faísca, P.¹, Gomes, J.^{1,2}, Botelho, M.³
 [Canine Ocular Onchocercosis in Portugal]
- [P93](#) Avaliação de um ensaio de PCR para diagnóstico de Herpesvírus Felino em animais com lesões oftalmológicas
 201
 Duarte, A., Alberto, A., Delgado, E., Sales Luis, J. e Tavares, L.
 [Evaluation of a PCR assay for Feline Herpesvirus diagnostic in cats with ophthalmological lesions]
- [P94](#) Rastreio virológico e subtipificação de Parvovírus dos canídeos e felídeos 202
 Veiga, I., Ramilo, D., Duarte, A., e Tavares, L.
 [Virological survey and subtyping of canine and feline Parvovirus]
- [P95](#) Relações anatomotopográficas cranioencefálicas entre 5 pontos craniométricos de referencia e a fissura
 longitudinal dorsal cerebral para procedimentos de neurocirurgia em canídeos braquicéfalos 203
 Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²
 [Anatomotopography cranium encephalic relations between 5 main craniometric points landmarks and longitudinal
 dorsal brain fissure to neurosurgery procedures in brachycephalus dogs]

- P96** Relações anatomotopográficas cranioencefálicas entre 5 pontos craniométricos de referencia e a fissura pseudosilviana para procedimentos de neurocirurgia em canídeos braquicéfalos 204
Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²
[Anatomotopography cranium encephalic relations between 5 main craniometric points landmarks and sylvian fissure to neurosurgery procedures in brachycephalus dogs]
- P97** Relações anatomotopográficas cranioencefálicas entre 5 pontos craniométricos de referencia e o seio venoso central para procedimentos de neurocirurgia em canídeos braquicéfalos 205
Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²
[Anatomotopography cranium encephalic relations between 5 main craniometric points landmarks and central venous synus to neurosurgery procedures in brachycephalus dogs]
- P98** Caracterização dos índices cefálicos numa população de canídeos braquicéfalos 206
Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Liste, F.²
[Characterization of cephalic index in a brachycephalus canine population]
- P99** A utilização da ultrassonografia no tecido cerebral de canídeo, como método de identificação das estruturas cerebrais para neuronavegação 207
Carreira, M.¹, Ferreira, A.J.¹, Sales-Luis, J.P.¹, Liste, F.²
[The use of ultrasound as a method for identification of brain structures for neuronavigation procedures]
- P100** Estudo comparativo das variações intra-cirúrgicas da temperatura esofágica e rectal em canídeos submetidos a cirurgia de tecidos moles e ortopédica 208
Carreira, M.^{1,2}, Costa, A.¹, Mendes, E.¹, Durana, J.¹, Paulino, L.¹, Pargana, A.¹, Iglésias, L.¹, Azevedo, P.¹
[Comparative study of oesophageal and rectal temperature in a canine population under orthopaedic and soft tissue surgery]
- P101** Estudo comparativo das variações da pressão arterial (sistólica/ diastólica/ média) em felídeos submetidos a cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica 209
Carreira, M.^{1,2}, Costa, A.¹, Mendes, E.¹, Fernandes, J.¹, Nobrega de Sá, F.¹
[Comparative study of blood pressure (systolic / diastolic / mean) intra-surgical changes in a feline population under orthopaedic and soft tissue surgery]
- 102** Estudo comparativo das variações da pressão arterial (sistólica/ diastólica/ média) em canídeos submetidos a cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica 210
Carreira, M.^{1,2}, Costa, A.¹, Mendes, E.¹, Fernandes, J.¹, Nobrega de Sá, F.¹
[Comparative study of blood pressure (systolic / diastolic / mean) intra-surgical changes in a canine population under orthopaedic and soft tissue surgery]
- Buiatria
- P103** Seroprevalência da anaplasmose bovina em Portugal 211
Gomes, J., Rebêlo, E.
[Seroprevalence of cattle anaplasmosis in Portugal]
- P104** Prevalência e sazonalidade da infecção por *Babesia*, *Theileria* e *Anaplasma* em bovinos de carne numa exploração do Ribatejo 212
Antunes, G.M.¹, Farrim, A.C.P.², Madeira de Carvalho, L.M.¹
[Prevalence and seasonality of infection by *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* in beef cattle on a farm in Ribatejo]
- P105** Parasitismo em bovinos da Raça Brava da ilha Terceira (Açores, Portugal) - dados preliminares 213
Crespo, M.¹, Rosa, F.², Correia, P.¹
[Parasitism in Brava breed from Terceira island (Azores, Portugal) - preliminary data]
- P106** Epidemiologia molecular de *S. uberis* de mastites de bovinos em explorações Portuguesas 214
Rato, M.G.¹, Bexiga, R.², Nunes, S.F.², Cavaco, L.M.², Vilela, C.L.², Santos-Sanches, I.¹ [Molecular epidemiology of *S. uberis* associated with bovine mastitis from Portuguese dairy farms]
- P107** Staphylococci coagulase-negativos e mastites bovinas – ainda agentes patogénicos menores? 215
Bexiga, R.¹, Oliveira, M.¹, Carneiro, C.¹, Ellis, K.² e Vilela, C.L.¹
[Coagulase-negative staphylococci and bovine mastitis – still minor pathogens?]

- [P108](#) Aspectos da epidemiologia da infecção do vírus da diarreia viral bovina nos Açores..... 216
 Benevides, S., Flor, L., Hernani, M.
 [Epidemiological aspects of the bovine viral diarrhoea virus infection in the Azores]
- [P109](#) Incidência e distribuição de patologias em efectivos bovinos leiteiros de alta produção na região de Aveiro 217
 Castro, D.¹, Ribeiro, C.¹, Simões, J.²
 [The incidence and distribution of diseases in dairy cattle farms of northwestern Portugal]
- [P110](#) Resolução de torções uterinas por método de rolamento em vacas: um estudo retrospectivo de 9 casos..... 218
 Simões, J.¹, Teixeira, F.², Mascarenhas, R.³
 [Treatment of uterine torsion by rolling the cow: a retrospective study of 9 cases]
- Outros assuntos
- [P111](#) Efeito da selecção genética na expressão e actividade das enzimas reguladoras do metabolismo intermediário no coelho..... 219
 van Harten, S.^{1,2}, Cardoso, L.A.^{1,2}
 [Effects of genetic selection on the expression and activity of intermediate metabolism regulatory enzymes in the rabbit]
- [P112](#) O CBM6-1 da celulase 5B do *Cellvibrio mixtus* liga-se a glúcans de ligações β -1,3 220
 Pires, V.M.R.¹, Prates, J.A.M.¹, Ferreira, L.M.A.¹, Gilbert, H.J.² e Fontes, C.M.G.A.¹
 [CBM6-1 of *Cellvibrio mixtus* cellulase 5B binds to beta-1,3-glucans]