



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Clínica de espécies pecuárias e equinos:**

**Avaliação epidemiológica da tuberculose bovina  
em espécies de caça maior, nas regiões do Alto  
Alentejo e Beira Interior Sul**

**Pedro Miguel Cunha Caetano**

Orientação: Dr. Ricardo Jorge da Costa Trindade

Palmeiro Romão

Orientação externa: Dr. Rui Jorge Baptista Martelo

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Relatório de Estágio

Évora, 2014



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Clínica de espécies pecuárias e equinos:**

**Avaliação epidemiológica da tuberculose bovina  
em espécies de caça maior, nas regiões do Alto  
Alentejo e Beira Interior Sul**

**Pedro Miguel Cunha Caetano**

Orientação: Dr. Ricardo Jorge da Costa Trindade

Palmeiro Romão

Orientação externa: Dr. Rui Jorge Baptista Martelo

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Relatório de Estágio

Évora, 2014

## Agradecimentos

Ao Dr. Ricardo Romão e ao Dr. Rui Martelo, meus orientadores de estágio, por me terem aceite como orientando e por toda a disponibilidade e paciência que demonstraram ao longo do estágio.

Ao Dr. Diogo Paralta, principal responsável pela minha integração na rotina do estágio e à adaptação à vida em Portalegre. Agradeço-lhe não só pelo que me ensinou mas também pela enorme quantidade de momentos bem passados, que ficarão para sempre na memória.

A todos os restantes elementos pertencentes à equipa da VetAL, que tão bem me receberam e me fizeram sentir em casa ao longo dos vários meses em que convivemos.

Ao Dr. Fernando Boinas, por todos os conhecimentos transmitidos e por ter sido fundamental na escolha final do tema deste trabalho.

À Dra. Rita Ribeiro e à Dra. Sara Madeira, por tudo o que me ensinaram e pela ajuda imprescindível sem a qual não teria sido possível realizar este trabalho.

Ao Dr. António Manteigas e à Dra. Maria José Correia, pela sua colaboração e fornecimento dos dados utilizados para este trabalho, recolhidos nas DIV's de Castelo Branco e Portalegre, respetivamente.

Ao Eng. Luís Caiola, por todo o auxílio disponibilizado, em particular na aplicação dos Sistemas de Informação Geográfica.

Ao Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, na pessoa do Eng. Fernando Queirós, pelo fornecimento dos dados referentes às zonas de caça.

À Dra. Elsa Duarte e à Dra. Manuela Vilhena, pela pronta disponibilidade em responderem às várias dúvidas que me foram surgindo ao longo do trabalho.

À Dra. Madalena Monteiro, do LNIV, pelos esclarecimentos fornecidos sobre as análises laboratoriais.

À minha família, em particular aos meus pais e irmãos, pela força que sempre me transmitiram para ultrapassar os desafios que a Vida nos coloca.

À Lúcia e aos meus amigos, pela imprescindível ajuda que me facultaram na elaboração deste trabalho.

A Deus.

## Resumo

A tuberculose bovina (TB) é uma doença infecciosa crónica que afeta um vasto leque de hospedeiros. É causada principalmente por *Mycobacterium bovis* e, em menor escala, *M. caprae*. A presença comprovada de *M. bovis* em espécies silváticas configura um obstáculo à erradicação da TB nos bovinos. Estudos epidemiológicos permitiram identificar uma área de risco para a doença, passando a ser obrigatório examinar as carcaças de todos os animais abatidos nessa zona. O presente estudo pretende avaliar os dados das montarias realizadas no Alto Alentejo e na Beira Interior Sul, desde a implementação do Edital nº1 em 2011, auxiliando na caracterização da situação epidemiológica da TB em javalis e veados. Os resultados do estudo apontam para a possibilidade de os veados terem uma prevalência de TB superior à dos javalis, sugerindo que são os primeiros os maiores responsáveis pela transmissão da TB aos bovinos na área transfronteiriça.

**Palavras-chave:** tuberculose bovina; *Mycobacterium bovis*; javali; veado; Beira Interior Sul; Alto Alentejo.

## Abstract

### Epidemiological study of bovine tuberculosis in hunted large species, in Beira Interior Sul and Alto Alentejo

Bovine tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease that affects a wide range of hosts. It is mainly caused by *Mycobacterium bovis* and, in a lower extent, *M. caprae*. The confirmed presence of *M. bovis* in wildlife reservoirs is a major obstacle to the eradication of TB in cattle. Epidemiological studies allowed the definition of a high risk area for the disease, becoming mandatory to examine all the animal carcasses hunted in that area. This study aimed to analyse data of drive hunts performed in Alto Alentejo and Beira Interior Sul, since the implementation of Edict 1 in 2011, helping to characterize the epidemiological status of TB in wild boar and red deer. The study results highlight the possibility of TB prevalence in red deer exceed that of wild boar, suggesting that red deer is the most responsible specie for transmission of TB to cattle in transboundary area.

**Keywords:** bovine tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; wild boar; red deer; Beira Interior Sul; Alto Alentejo.

## Índice geral

Agradecimentos.....	I
Resumo .....	II
Abstract .....	III
Índice geral .....	IV
Índice de figuras .....	VII
Índice de gráficos .....	VIII
Índice de tabelas .....	IX
Lista de abreviaturas .....	XI
1) Introdução .....	1
1.1) Descrição do local de estágio .....	1
2) Casuística.....	2
2.1) Medicina Preventiva.....	3
2.1.1) Ações profiláticas obrigatórias .....	3
2.1.1.1) Programa de erradicação da tuberculose nos bovinos .....	4
2.1.1.2) Programa de erradicação da brucelose em bovinos.....	5
2.1.1.3) Programa de erradicação da brucelose em pequenos ruminantes .....	5
2.1.2) Ações profiláticas facultativas .....	6
2.1.2.1) Vacinação .....	6
2.1.2.2) Desparasitação.....	8
2.2) Assistência reprodutiva .....	10
2.2.1) Espécies pecuárias .....	10
2.2.2) Equídeos .....	14
2.3) Patologia clínica.....	17
2.3.1) Clínica de bovinos.....	17
2.3.1.1) Neonatologia .....	18
2.3.1.2) Sistema reprodutor.....	20
2.3.1.3) Sistema respiratório.....	23
2.3.1.4) Sistema digestivo.....	24
2.3.1.5) Sistema musculoesquelético.....	25
2.3.1.6) Pele e anexos .....	26
2.3.1.7) Outros casos .....	27
2.3.1.8) Outros procedimentos.....	27
2.3.2) Clínica de pequenos ruminantes.....	28
2.3.3) Clínica de equídeos .....	29
2.3.3.1) Sistema locomotor.....	30

2.3.3.2) Pele e anexos.....	31
2.3.3.3) Odontologia .....	32
2.3.3.4) Sistema respiratório .....	33
2.3.3.5) Sistema digestivo .....	34
2.3.3.6) Sistema musculoesquelético .....	35
2.3.3.7) Oftalmologia .....	36
2.3.3.8) Outros casos.....	36
2.3.3.9) Outros procedimentos .....	30
2.4) Exame inicial em montarias .....	37
3) Revisão bibliográfica da tuberculose bovina.....	39
3.1) Introdução .....	39
3.2) Etiologia.....	39
3.3) Epidemiologia.....	40
3.4) Patogénese .....	41
3.5) Diagnóstico <i>ante-mortem</i> .....	42
3.6) Diagnóstico <i>post-mortem</i> .....	43
3.7) Programa de erradicação em Portugal.....	45
3.7.1) Implementação do Edital nº1 da DGAV .....	47
3.8) Epidemiologia dos reservatórios silváticos da doença .....	49
3.8.1) A situação na Península Ibérica.....	50
3.9) Caracterização das lesões.....	53
3.9.1) Localização anatómica.....	53
3.9.2) Histologia.....	54
3.9.3) Distribuição etária e sexual.....	54
3.10) Medidas de controlo.....	55
3.11) Implicações em Saúde Pública.....	56
4) Estudo epidemiológico da TB em espécies de caça maior, na Beira Interior Sul e no Alto Alentejo.....	58
4.1) Introdução .....	58
4.2) Material e métodos.....	59
4.2.1) Área de Estudo .....	59
4.2.2) Recolha de dados .....	59
4.2.3) Exame inicial .....	60
4.2.4) Análise dos dados.....	60
4.3) Resultados .....	60
4.3.1) Caracterização dos animais abatidos .....	60
4.3.2) Caracterização dos animais rejeitados .....	64
4.3.3) Cálculo das prevalências .....	65
4.3.4) Variáveis de risco.....	67

4.3.5) Definição das zonas de risco .....	67
4.3.6) Isolamento bacteriano .....	70
4.3.7) Concordância dos testes laboratoriais .....	71
4.3.8) Resultados da spoligotipagem .....	72
4.3.9) Localização das LSTB .....	72
4.4) Discussão .....	74
4.5) Conclusão .....	80
5) Bibliografia.....	83
Anexo 1 – Fluxograma dos estatutos sanitários para a tuberculose bovina .....	91

## Índice de figuras

Figura 1 - Ectima contagioso num ovino.....	7
Figura 2 - Desparasitação de um leitão.....	9
Figura 3 - Controlo reprodutivo numa vaca, com recurso a ecografia trans-retal.....	11
Figura 4 - Mesa de campo utilizada na realização dos exames andrológicos.....	12
Figura 5 - Lesão suspeita de besnoitiose no escroto de um touro.....	13
Figura 6 - Controlo reprodutivo numa burra, com recurso a ecografia trans-retal.....	15
Figura 7 - Colheita de sémen num garanhão, com recurso a um manequim.....	16
Figura 8 - Cesariana numa vaca.....	21
Figura 9 - Elevação de uma vaca caída, com recurso a uma pinça de ancas.....	26
Figura 10 - Teste de sensibilidade nos cascos de um equino, com recurso à pinça de cascos.....	30
Figura 11 - Radiografia da extremidade distal do membro posterior esquerdo de um equino.....	31
Figura 12 - Exame inicial em carcaças de javali.....	38
Figura 13 - LSTB num ln. submandibular de javali.....	38
Figura 14 - Zona de Risco definida pelo Edital nº1 (adaptado de DGAV, 2011).....	48
Figura 15 - Mapa da PI com a prevalência de TB em javalis por região administrativa (adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2012).....	51
Figura 16 - Distribuição por espécie dos padrões de <i>M. bovis</i> presentes na PI (adaptado de Duarte <i>et al.</i> , 2008).....	52
Figura 17 - Localização geográfica da área de estudo.....	59
Figura 18 - Distribuição geográfica dos javalis abatidos na área de estudo.....	63
Figura 19 - Distribuição geográfica dos veados abatidos na área de estudo.....	63
Figura 20 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis na BIS, por época venatória.....	68
Figura 21 - Distribuição geográfica dos casos de TB em veados na BIS, por época venatória.....	69
Figura 22 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis no AA, por época venatória.....	70
Figura 23 - Distribuição geográfica dos casos de TB em veados no AA, por época venatória.....	70

## Índice de gráficos

Gráfico 1 - Ações profiláticas facultativas em cada espécie, em número absoluto.....	6
Gráfico 2 - Representação gráfica da distribuição relativa das ações de assistência reprodutiva pelas espécies (n=1095). .....	10
Gráfico 3 - Taxa de aprovação nos exames andrológicos de touros (n=80).....	12
Gráfico 4 - Taxa de aprovação nos exames andrológicos de carneiros (n=77). .....	12
Gráfico 5 - Representação gráfica dos motivos de reprovação dos exames andrológicos de touros (n=16). .....	14
Gráfico 6 - Representação gráfica dos motivos de reprovação dos exames andrológicos de carneiros (n=16). .....	14
Gráfico 7 - Representação gráfica do tipo de sémen utilizado nas inseminações (n=47).....	15
Gráfico 8 - Representação da distribuição relativa das ações de clínica pelas espécies (n=282). .....	17
Gráfico 9 - Distribuição da casuística de clínica, em bovinos, pelo sistema envolvido, em número absoluto (n=139). .....	18
Gráfico 10 - Exames complementares na espécie bovina, em número absoluto (n=139). .....	28
Gráfico 11 - Distribuição da casuística de clínica, em equídeos, pelo sistema envolvido, em número absoluto (n=90). .....	29
Gráfico 12 - Exames complementares em equinos, em número absoluto (n=53). .....	37
Gráfico 13 - Evolução dos indicadores epidemiológicos sobre a TB em Portugal, entre 2007 e 2012 (adaptado de DGAV, 2013a).....	46
Gráfico 14 - Resultados dos inquéritos epidemiológicos realizados em 2010 (adaptado de European Commission, 2010).....	47
Gráfico 15 - Tendência evolutiva do nº de javalis abatidos, por região. ....	61
Gráfico 16 - Tendência evolutiva do nº de veados abatidos, por região. ....	61
Gráfico 17 - Evolução da prevalência da TB em veados, por região.....	66
Gráfico 18 - Evolução da prevalência da TB em javalis, por região. ....	66
Gráfico 19 - Distribuição dos resultados do isolamento bacteriano em LSTB de javalis (%; n=375).....	71
Gráfico 20 - Distribuição dos resultados do isolamento bacteriano em LSTB de veados (%; n=294).....	71
Gráfico 21 - Distribuição da localização das lesões em javalis com TB (%; n=240). ....	73
Gráfico 22 - Distribuição da localização das lesões em veados com TB (%; n=275). ....	73
Gráfico 23 - Disseminação das LSTB em javalis (%; n=226). ....	73
Gráfico 24 - Disseminação das LSTB em veados (%; n=252). ....	73

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Intervenções realizadas em cada espécie e área de atuação, em número absoluto e FR (% , n=20750).	2
Tabela 2 - Intervenções nas várias ações profiláticas obrigatórias, em número absoluto e FR (% , n=6180).	3
Tabela 3 - Exames coprológicos realizados por espécie e tipo de amostragem, amostras com formas parasitárias e amostras com níveis parasitários superiores ao limiar de tratamento, em número absoluto e FR (% , n=92).	8
Tabela 4 - Ações de assistência reprodutiva nas espécies pecuárias, em número absoluto e FR (% , n=695).	11
Tabela 5 - Ações de assistência reprodutiva nas espécies pecuárias, em número absoluto e FR (% , n=400).	14
Tabela 6 - Casos clínicos em neonatologia, em número absoluto e FR (% , n=45).	18
Tabela 7 - Casos clínicos envolvendo o sistema reprodutor de bovinos, em número absoluto e FR (% , n=29).	20
Tabela 8 - Causas de distócia, em número absoluto e FR (% , n=16).	21
Tabela 9 - Casos clínicos envolvendo o sistema digestivo de bovinos, em número absoluto e FR (% , n=13).	24
Tabela 10 - Casos clínicos envolvendo o sistema musculoesquelético de bovinos, em número absoluto e FR (% , n=12).	25
Tabela 11 - Casos clínicos da área pele e anexos de bovinos, em número absoluto e FR (% , n=7).	26
Tabela 12 - Número absoluto e FR (% , n=9) de outros casos clínicos acompanhados na espécie bovina.	27
Tabela 13 - Casos clínicos de ovinos, em número absoluto e FR (% , n=45).	28
Tabela 14 - Casos clínicos de caprinos, em número absoluto e FR (% , n=8).	29
Tabela 15 - Casos clínicos envolvendo o sistema locomotor de equinos, em número absoluto e FR (% , n=27).	30
Tabela 16 - Casos clínicos da área pele e anexos em equídeos, em número absoluto e FR (% , n=24).	31
Tabela 17 - Casos clínicos de odontologia de equinos, em número absoluto e FR (% , n=17).	32
Tabela 18 - Casos clínicos envolvendo o sistema respiratório de equinos, em número absoluto e FR (% , n=5).	33
Tabela 19 - Casos clínicos envolvendo o sistema digestivo de equinos, em número absoluto e FR (% , n=4).	34
Tabela 20 - Número absoluto e FR (% , n=8) de outros casos clínicos acompanhados em equinos.	36
Tabela 21 - Exames iniciais e rejeições por espécie caçada, em número absoluto e FR (% , n=178).	38
Tabela 22 - Abates de javalis por região e época venatória, em número absoluto (n= 4030).	61

Tabela 23 - Abates de veados por região e época venatória, em número absoluto (n= 5180)..	61
Tabela 24 - Abates por Concelho e Freguesia da BIS, em número absoluto e FR (%; n=5960). .....	62
Tabela 25 - Abates por Concelho e Freguesia do AA, em número absoluto e FR (%; n=3250).	62
Tabela 26 - Distribuição etária e sexual dos javalis abatidos, em número absoluto e FR (%; n=4030).....	64
Tabela 27 - Distribuição etária e sexual dos veados abatidos, em número absoluto e FR (%; n=5180).....	64
Tabela 28 - Taxa de rejeição em javalis, por região e época venatória (%).	64
Tabela 29 - Taxa de rejeição em veados, por região e época venatória (%).	64
Tabela 30 - Número estimado de casos, por espécie, região e época venatória.....	65
Tabela 31 - Prevalência da TB em javalis e veado, por região e época venatória (%).	66
Tabela 32 - Prevalências de TB estimadas por espécie e região (%)* .....	66
Tabela 33 - Estatística inferencial para determinação das variáveis que estão associadas à infecção por <i>M. bovis</i> . .....	67
Tabela 34 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis e veados na BIS, em número absoluto e FR (%; n=461). .....	68
Tabela 35 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis e veados no AA, em número absoluto e FR (%; n=72). .....	69
Tabela 36 - Distribuição dos resultados das duas técnicas laboratoriais em javalis, em número absoluto (n=371). .....	71
Tabela 37 - Distribuição dos resultados das duas técnicas laboratoriais em veados, em número absoluto (n=291). .....	71
Tabela 38 - Resultados da spoligotipagem por espécie, em número absoluto (n=23). .....	72
Tabela 39 - Localização das LSTB em javalis, em número absoluto e FR (%; n=240). .....	73
Tabela 40 - Localização das LSTB em veados, em número absoluto e FR (%; n=275).....	73
Tabela 41 - Dados de outros estudos semelhantes, realizados na PI.....	75

## Lista de abreviaturas

AA – Alto Alentejo	IDC – Intradermotuberculização comparada
AINE – Anti-inflamatório não esteroide	IV – Intravenosa
BCG – Bacilo <i>Calette-Guérin</i>	LH – Hormona luteinizante
BIS – Beira Interior Sul	Inn. – linfonodos
BRSV – <i>Bovine Respiratory Syncytial Virus</i>	LSTB – Lesão suspeita de tuberculose bovina
BVDV – <i>Bovine Viral Diarrhoea Virus</i>	MIRU-VNTR – <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeats</i>
CAMV – Centro de atendimento médico-veterinário	MAC – <i>Mycobacterium avium complex</i>
DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária	MTC – <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
DIV – Divisão de Intervenção Veterinária	PCR – <i>polymerase chain reaction</i>
DMSO – Dimetilsulfóxido	PGF <sub>2α</sub> – Prostaglandina F <sub>2α</sub>
DNA – Ácido desoxirribonucleico	PI – Península Ibérica
DROC – Doença respiratória obstrutiva crónica	PI-3 – <i>Parainfluenza virus</i> tipo 3
DSAVR - Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional	PNSA – Plano Nacional de Saúde Animal
eCG – Gonadotropina coriónica equina	RMF – Retenção de membranas fetais
EUA – Estados Unidos da América	SRB – Síndrome respiratória bovina
FSH – Hormona folículo estimulante	TB – Tuberculose bovina
FR – Frequência relativa	TPM – Teste de pré-movimentação
GIS – <i>Geographical Information System</i>	VetAI – Clínica Veterinária do Alto Alentejo
GPS – <i>Global Positioning System</i>	VPN – Valor preditivo negativo
hCG – Gonadotropina coriónica humana	VPP – Valor preditivo positivo
HV-1 – <i>Herpesvirus</i> tipo 1	
IBRV – <i>Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus</i>	

## 1) Introdução

O presente relatório reporta as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular efetuado nas áreas de clínica de espécies pecuárias e equinos, o qual se insere no *Mestrado Integrado em Medicina Veterinária* da Universidade de Évora. O estágio foi realizado no período compreendido entre 4 de novembro de 2013 a 2 de maio de 2014, na VetAl – *Clínica Veterinária do Alto Alentejo* (VetAl) em Portalegre, sob a orientação do Dr. Ricardo Romão e co-orientação do Dr. Rui Martelo.

O objetivo maior do estágio foi adquirir competências que permitam lidar com situações várias com que o médico veterinário se depara na sua atividade quotidiana, nomeadamente no domínio da intervenção clínica e na aplicação dos planos sanitários e profiláticos. Deste modo, o estágio permitiu ter um contacto efetivo com os produtores de espécies pecuárias e proprietários de equinos, tendo possibilitado a obtenção de uma visão sobre a realidade do trabalho de campo e, ao mesmo tempo, viabilizou a aplicação prática dos distintos conhecimentos teóricos alcançados ao longo do curso.

Foi escolhido como caso de estudo a desenvolver durante o estágio a “*Tuberculose em espécies de caça maior*”, em virtude de ter sido uma realidade com que nos deparámos em várias montarias acompanhadas. Esta problemática é uma das responsáveis pelo facto de ainda não se ter conseguido a erradicação da tuberculose nos bovinos, quer em Portugal quer em vários países um pouco por todo o mundo. Assim, foram recolhidos dados nas montarias realizadas na área de intervenção das Divisões de Intervenção Veterinária (DIV) de Portalegre e Castelo Branco, referentes às épocas venatórias de 2011/2012, 2012/2013 e 2013/2014. É relevante referir que parte dos dados usados neste estudo já tinham sido considerados para a realização do estudo de Madeira *et al.* (2014).

### 1.1) Descrição do local de estágio

A VetAl, fundada em novembro de 2005, tem sede num Centro de Atendimento Médico-Veterinário (CAMV) localizado em Portalegre. As instalações dispõem de laboratório de análises clínicas (equipado com microscópio ótico, aparelho de hemograma e equipamento para análises bioquímicas) e meios complementares de diagnóstico imagiológico, nomeadamente o equipamento necessário para a realização de exame radiográfico e ecográfico.

O CAMV fornece ainda serviço domiciliário para espécies pecuárias, equinos e animais de companhia, possuindo para tal duas unidades móveis para as deslocações, uma carrinha comercial e uma viatura todo-o-terreno, completamente equipadas com o material necessário para dar assistência no local. Existe também a possibilidade de atrelar um reboque no veículo todo-o-terreno, para o transporte de equinos sempre que tal seja necessário.

Na área das espécies pecuárias e equinos são assegurados os serviços de clínica, cirurgia, profilaxia e assistência reprodutiva, serviço de urgências (disponível 24 horas por dia) e internamento de equídeos e pequenos ruminantes.

A equipa técnica da VetAI é constituída por seis médicos veterinários e três enfermeiras veterinárias. A VetAI mantém ainda colaboração ativa com a empresa “e-Vetal eventos Lda.”, de localização contígua e que se dedica à prática de atividades com animais no âmbito desportivo e lúdico, sobretudo com equídeos. As instalações são constituídas por 22 boxes, três *paddocks* e três picadeiros, os quais suportam a prática de equitação. A equipa da e-Vetal é composta também por tratadores de cavalos e equitadores, dispondo ainda de ferrador próprio. Para este serviço dispõe de veículo comercial totalmente equipado para o desempenho de serviço siderotécnico.

## 2) Casuística

Nesta secção procederemos à apresentação dos dados relativos à casuística coberta durante o estágio, baseados nos apontamentos recolhidos diariamente. Tais dados estão agrupados por domínio de intervenção (ações de profilaxia, assistência reprodutiva e clínica) e por espécies intervencionadas (bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos e asininos). Estes elementos serão expostos com recurso a gráficos e tabelas, em forma de frequência absoluta, equivalendo ao número de intervenções, e/ou frequência relativa (FR), em termos percentuais. É importante notar que na área da clínica foram englobadas as ações de clínica médica e cirúrgica.

A tabela 1 sumariza o conjunto de intervenções por espécie e domínio de atuação. É essencial notar que para o elevado número de intervenções na área da profilaxia contribui o facto de, na maioria dos saneamentos anuais, ocorrerem em simultâneo a vacinação, a desparasitação e as ações profiláticas obrigatórias, o que representa três intervenções distintas.

*Tabela 1 - Intervenções realizadas em cada espécie e área de atuação, em número absoluto e FR (%; n=20750).*

<b>Espécie</b>	<b>Profilaxia</b>	<b>Clínica</b>	<b>Assistência Reprodutiva</b>	<b>Total</b>	<b>FR</b>
<b>Bovina</b>	11089	139	297	11525	55,5%
<b>Ovina</b>	7296	45	398	7739	37,3%
<b>Caprina</b>	858	8	0	866	4,2%
<b>Suína</b>	86	0	0	86	0,4%
<b>Equídeos</b>	44	90	400	534	2,6%
<b>Total</b>	19373	282	1095	<b>20750</b>	100,0%
<b>FR</b>	93,4%	1,4%	5,3%	100,0%	

Através da observação da tabela 1 é possível constatar que as ações de profilaxia representaram 93,4% do total de intervenções, a assistência reprodutiva 5,3% e a clínica 1,4%.

As espécies bovina, com 55,5% das ações veterinárias, e os ovinos, com 37,3%, foram as espécies mais intervencionadas. Os caprinos, equídeos e suínos representam, respetivamente, 4,2%, 2,6% e 0,4% do total de intervenções.

## 2.1) Medicina Preventiva

Na área da medicina preventiva incluíram-se as intervenções obrigatórias previstas no *Plano Nacional de Saúde Animal* (PNSA) e as ações profiláticas facultativas, tais como as vacinações e desparasitações.

### 2.1.1) Ações profiláticas obrigatórias

As ações de profilaxia obrigatória estão incluídas no PNSA e destinam-se às espécies ruminantes. Neste Plano inscrevem-se os programas de erradicação e vigilância epidemiológica, bem como as ações de controlo para prevenção de algumas das doenças animais (Portaria 178/2007 de 9 de fevereiro).

No caso dos bovinos, as ações de profilaxia obrigatória corresponderam ao saneamento anual obrigatório, aos testes de pré-movimentação (TPM) e às reinspeções do efetivo, à tuberculose e à brucelose. No caso dos pequenos ruminantes, estas intervenções foram circunscritas ao estabelecido para o saneamento anual obrigatório, nomeadamente o rastreio da brucelose. Tal como se pode observar na tabela 2, as ações com maior expressão ocorreram nos saneamentos obrigatórios de bovinos e ovinos, com 3230 e 2235 animais intervencionados, respetivamente.

Tabela 2 - Intervenções nas várias ações profiláticas obrigatórias, em número absoluto e FR (%; n=6180).

Ações profiláticas obrigatórias	Nº de intervenções	FR
Saneamento bovinos	3230	52,3%
TPM bovinos	232	3,8%
Reinspeção brucelose bovinos	122	2,0%
Reinspeção tuberculose bovinos	91	1,5%
Saneamento ovinos	2235	36,2%
Saneamento caprinos	270	4,4%
<b>Total</b>	<b>6180</b>	<b>100,0%</b>

Na espécie bovina, as intervenções sanitárias incluem o rastreio da brucelose, através de provas serológicas realizadas com amostras de sangue colhidas na veia coccígea mediana, e da tuberculose, por via da prova de intradermotuberculização comparada (IDC) e leitura dos resultados 72h após a inoculação. Nos pequenos ruminantes, apenas é realizado o rastreio da brucelose, sendo a prova idêntica à dos bovinos, embora a colheita sanguínea seja normalmente realizada na veia jugular externa. Durante o estágio foram efetuadas 3437

colheitas de amostras de sangue em bovinos, 1198 em ovinos e 189 em caprinos, de acordo com o PNSA. Foram ainda executadas 339 identificações eletrónicas com introdução do *bolus* reticular em ovinos e 56 em caprinos, com idade compreendida entre os 5 e os 9 meses.

#### **2.1.1.1) Programa de erradicação da tuberculose nos bovinos**

A tuberculose bovina (TB) é uma doença crónica causada pelas bactérias *Mycobacterium bovis* e *M. caprae*. Esta doença afeta um vasto leque de hospedeiros, entre os quais se inclui a espécie humana. Tal doença será tratada posteriormente com maior detalhe.

O Decreto-Lei n.º 272/2000 define as normas técnicas para a execução do programa de erradicação da TB, assim como os procedimentos relativos à classificação sanitária de efetivos. No território de Portugal continental, o programa abarca todas as explorações, com exceção daquelas com vocação exclusiva de recria e acabamento de bovinos, pois destinam-se ao abate. A região do Algarve também apresenta algumas especificidades, já que desde 2012 a zona é considerada oficialmente indemne para a tuberculose.

O programa de erradicação tem por base vários princípios como a deteção em vida, a vigilância de rotina em matadouro, o abate dos animais considerados positivos no diagnóstico em vida, a indemnização dos detentores dos animais abatidos e a restrição de movimentos nos respetivos efetivos. A confirmação laboratorial, realizada através de exame bacteriológico, está a cargo do *Laboratório Nacional de Investigação Veterinária* (LNIV) (DGAV, 2013a).

A prova oficial de diagnóstico em vida é a denominada IDC, sendo a prova do gama-interferão usada como meio complementar de confirmação. A frequência de realização dos testes de diagnóstico e a idade dos animais a ensaiar depende do risco que é atribuído à região onde se insere a exploração. Na zona de Portalegre a proporção de efetivos infetados nos últimos dois anos foi superior a 1%, pelo que é obrigatório testar com periodicidade mínima anual todos os bovinos com mais de seis semanas de idade (DGAV, 2013a).

Um animal é considerado positivo à prova da IDC caso apresente uma reação à tuberculina bovina superior à reação da tuberculina aviária em pelo menos quatro milímetros. A presença de sinais clínicos, tais como edema, exsudado, necrose, dor ou inflamação regionais, também atribui efeito positivo ao teste. Um resultado duvidoso na prova IDC, sempre que o diferencial entre a reação bovina e aviária se situe entre um e quatro milímetros, obriga a uma repetição do teste passados 42 dias, sendo que nesta situação para o animal ser considerado positivo basta apresentar um resultado não negativo.

Os estatutos sanitários são atribuídos ou alterados pelos serviços oficiais e dividem-se em oficialmente indemne (T3), não indemne em saneamento (T2) e não indemne infetado (T2.1). O estatuto indemne pode evoluir para suspenso (T3S), de acordo com os resultados obtidos nos controlos (DGAV, 2013a). No anexo 1 esquematizamos os critérios aplicados no caso de alteração do estatuto sanitário dos efetivos.

#### 2.1.1.2) Programa de erradicação da brucelose em bovinos

A brucelose é uma zoonose causada pela *Brucella abortus* e, em menor grau, pela *B. melitensis*. Esta doença já se encontra erradicada em muitos países e em Portugal a situação está parcialmente controlada, sendo os Açores a região mais problemática. Os sinais clínicos mais frequentes são o aborto no último terço da gestação. As vacas que não abortam originam vitelos débeis, portadores vitalícios da infeção latente, enquanto os machos apresentam orquite, epididimite e inflamação dos órgãos reprodutivos acessórios (Stilwell, 2013).

O Decreto-Lei nº244/2000 de 27 de setembro define os procedimentos do programa de erradicação. O controlo serológico tem como prova oficial o teste *Rosa de Bengala*, em que se pesquisam anticorpos anti-*Brucella*, e o teste de fixação do complemento, que constitui a prova complementar e é, simultaneamente, responsável pela definição da positividade para efeitos de abate sanitário. A prova oficial realiza-se em todos os bovinos com idade superior a 12 meses, estando excluídos os machos destinados a acabamento em explorações indemnes. As explorações abrangidas no programa são anualmente sujeitas a controlo serológico, baseado no facto da percentagem de efetivos infetados ser menor que 1% do total de efetivos nas regiões continentais.

A brucelose é uma doença de declaração obrigatória desde 1953, sendo explicitamente proibido qualquer tratamento da doença. Desta forma, a erradicação da brucelose bovina tem por base o diagnóstico em vida, o abate compulsivo (da responsabilidade dos serviços oficiais) dos animais considerados positivos nos testes *Rosa Bengala* e fixação do complemento, a indemnização dos proprietários dos animais abatidos e a restrição de movimentos dos respetivos efetivos. A vacinação é também uma das medidas previstas no programa de erradicação, embora a aplicação da vacina RB51 só possa ser autorizada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), estando normalmente limitada a zonas em que houve confirmação da infeção e nas suas áreas limítrofes (DGAV, 2013b).

Atualmente as classificações sanitárias existentes no caso da brucelose são: B2 – efetivo não indemne; B3 – efetivo indemne; B4 – efetivo oficialmente indemne. Para além destas, existem ainda as classificações B3S e B4S, correspondentes a efetivos B3 e B4 suspensos, respetivamente, e a classificação B2.1, que é atribuída aos efetivos não indemnes em que foi possível proceder ao isolamento bacteriano. Nas explorações B2.1 é obrigatória a realização de inquérito epidemiológico nos 15 dias seguintes à confirmação laboratorial (DGAV, 2013b).

#### 2.1.1.3) Programa de erradicação da brucelose em pequenos ruminantes

A brucelose em pequenos ruminantes, causada pela *Brucella melitensis*, também está coberta por um programa nacional de erradicação que, tal como nos bovinos, se baseia no Decreto-Lei nº244/2000 de 27 de setembro. O rastreio é obrigatório para todos os ovinos e caprinos com idade superior a 6 meses, ou 18 meses se vacinados com REV-1. Todavia, se determinada unidade epidemiológica tiver pelo menos 99,8% dos rebanhos em classificação sanitária B3 ou

B4, o controlo sorológico deverá ser anual e realizado numa amostra representativa dos rebanhos B3 e B4. Assim, deve ser feita pesquisa da brucelose nos machos não castrados com mais de 6 meses, nos animais introduzidos desde o controlo anterior e em 25% das fêmeas em idade reprodutiva (DGAV, 2013c).

Nas áreas geográficas consideradas de risco e nas explorações infetadas procede-se à vacinação conjuntival com REV-1 das fêmeas jovens. A decisão de iniciar ou parar os processos de vacinação está sempre sujeita à autorização da DGAV (DGAV, 2013c). As provas serológicas do programa e a classificação sanitária atribuída aos efetivos são similares às anteriormente referidas para os bovinos.

### 2.1.2) Ações profiláticas facultativas

As ações profiláticas realizadas opcionalmente pelos proprietários cobriram as vacinações e desparasitações, tendo sido realizadas em todas as espécies, tal como se observa no gráfico 1.

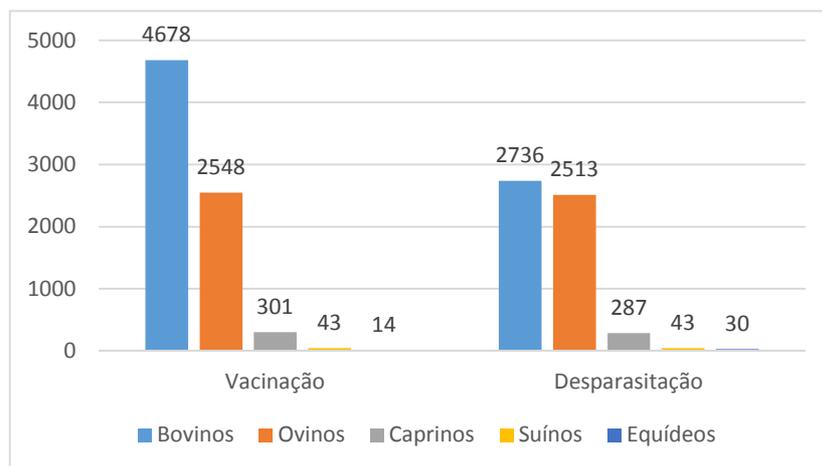


Gráfico 1 - Ações profiláticas facultativas em cada espécie, em número absoluto.

A análise do gráfico 1 permite constatar que as espécies em que se realizaram um maior número de intervenções foram os bovinos, com 4678 vacinações e 2736 desparasitações, e os ovinos, com 2548 vacinações e 2513 desparasitações. Nos ruminantes, a maioria destas intervenções foi efetuada em simultâneo com o saneamento obrigatório. No que respeita às restantes espécies, as intervenções foram bastante inferiores às anteriormente apresentadas.

#### 2.1.2.1) Vacinação

A imunização tem-se revelado como a forma mais prática e eficaz de prevenção contra as doenças infecciosas, uma vez que a vacinação confere aos animais mecanismos de resistência contra agentes patogénicos específicos (Maclachlan & Dubovi, 2011). A vacinação contra as espécies patogénicas pertencentes ao género *Clostridium* é um ponto comum entre os planos vacinais dos vários ruminantes.

No que respeita aos bovinos, a vacinação contra a enterotoxemia foi executada com vacinas multivalentes, nomeadamente as variedades Miloxan<sup>®</sup>, Multivac 9<sup>®</sup> e Covexin 10<sup>®</sup>. Esta última tem um espetro de ação mais alargado, conferindo uma resposta imunitária significativa contra as toxinas *alfa*, *beta* e *epsilon* do *Clostridium perfringens* tipo A, B, C e D e as toxinas do *Cl. septicum*, *Cl. tetani*, *Cl. sordellii*, *Cl. chauvoei*, *Cl. haemolyticum* e *Cl. novyi* tipo B e C. Por seu lado, a vacina Multivac 9<sup>®</sup> não confere proteção contra *Cl. haemolyticum* e a Miloxan<sup>®</sup> não protege os animais contra *Cl. haemolyticum* nem contra a toxina *alfa* do *Cl. perfringens*.

Em algumas explorações foram também aplicadas vacinações contra os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV), da diarreia viral bovina (BVDV), vírus sincicial bovino (BRSV) e, ainda, da parainfluenza tipo 3 (PI-3), tendo sido usado para esse efeito a vacina Hiprabovis 4<sup>®</sup>. Nas explorações destinadas à engorda de bezerros, os animais eram vacinados dois ou três dias após chegada à exploração com a vacina Bovipast<sup>®</sup>, a qual garante imunidade contra *Manheimia haemolytica* serótipo A1, *Pasteurella multocida*, BRSV e PI-3.

Nos pequenos ruminantes, a grande maioria das vacinações aplicadas cobriu também as clostridioses, tendo-se utilizado Miloxan<sup>®</sup>, Multivac 9<sup>®</sup> ou Basquin Plus<sup>®</sup>. Esta última vacina tem a vantagem de imunizar, não só contra as estirpes de *Clostridium perfringens*, mas também contra *Escherichia coli*, *Manheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*.

Nos efetivos de ovinos com aptidão leiteira efetuaram-se dois tipos de vacinação. Uma visava a proteção contra a agaláxia contagiosa, cujo agente causal é *Mycoplasma agalactiae*, tendo-se usado a Myo-galax<sup>®</sup>. A outra vacina utilizada, a Bedsa-Vac<sup>®</sup>, protege sobre a *Chlamydia psittaci* e a *Salmonella abortus ovis*, ambas responsáveis por aborto.

Realizou-se ainda a vacinação de um rebanho de ovinos com Overvac<sup>®</sup>, vacina viva atenuada de um *Parapoxvirus* que é o agente causal do ectima contagioso (figura 1).



Figura 1 - Ectima contagioso num ovino.

Os suínos intervencionados foram submetidos a vacinação com Ruvax<sup>®</sup>, vacina inativada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* serótipo 2 (agente etiológico do mal rubro), e com Strepsuis<sup>®</sup>, vacina inativada de *Streptococcus suis* serótipo 2.

Para a vacinação dos equinos utilizou-se a vacina EQUILIS Prequenza-TE<sup>®</sup> que contém o toxóide tetânico e subunidades de hemaglutinina purificada dos vírus da influenza equina.

#### 2.1.2.2) Desparasitação

A equipa da VetAI realiza periodicamente a monitorização do nível de endoparasitismo, para aferir se é justificável proceder à desparasitação. Os exames coprológicos realizados em cada amostra foram a sedimentação para a pesquisa de ovos de tremátodes e a flutuação para a pesquisa de formas parasitárias leves, como são ovos de nemátodes, os ovos de céstodes e os oocistos de protozoários. A pesquisa por via da flutuação englobou o método qualitativo de Willis e o método quantitativo, em que se recorreu à utilização da câmara de McMaster.

No decurso do estágio foram realizados exames coprológicos em 92 amostras. A tabela 3 apresenta a distribuição das amostras por espécie, por tipologia de amostragem realizada e por deteção de formas parasitárias. O limiar de tratamento considerado nas várias espécies está de acordo com os parâmetros definidos por Madeira de Carvalho (2001), citado por Duro (2010), situando-se nos 300-600 ovos por grama de fezes (OPG) nos bovinos, 1000 a 3000 OPG nos ovinos e 250 a 500 OPG para os equinos.

Tabela 3 - Exames coprológicos realizados por espécie e tipo de amostragem, amostras com formas parasitárias e amostras com níveis parasitários superiores ao limiar de tratamento, em número absoluto e FR (%), n=92).

Espécie	Amostragem	Nº de amostras	Nº de amostras com formas parasitárias (%)	Nº de amostras com níveis parasitários > ao limiar de tratamento (%)
Bovinos	Grupo	40	21 (52,5%)	5 (12,5%)
	Individual	6	2 (33,3%)	0 (0,0%)
Ovinos	Grupo	1	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	Individual	3	3 (100,0%)	2 (66,7%)
Caprinos	Grupo	2	2 (100,0%)	2 (100,0%)
	Individual	1	1 (100,0%)	1 (100,0%)
Equinos	Grupo	1	1 (100,0%)	1 (100,0%)
	Individual	32	29 (90,6%)	10 (31,3%)
Asininos	Grupo	0	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	Individual	6	6 (100,0%)	4 (66,7%)
Total		92	65	25

Pela observação da tabela anterior pode-se concluir que os bovinos e os equinos foram as espécies em se realizou maior número de exames coprológicos. Uma parte significativa das amostras de bovinos foi efetivada em amostragem de grupo, tendo-se recolhido fezes diretamente da ampola retal no mínimo a 10% dos indivíduos do efetivo total. No caso dos equinos, em virtude de a maioria dos animais estarem estabulados separadamente, foram colhidas amostras individuais. Os restantes exames coprológicos de amostras individuais foram realizados em situações suspeitas de níveis de parasitismo elevados ou, ainda, em animais que apresentavam sintomatologia compatível com afeção do trato digestivo.

As várias formas parasitárias detetadas foram ovos tipo estrôngilo (em todas as espécies), oocistos (nos ruminantes), ovos de ascarídeo (em equídeos) e ovos de *Moniezia benedeni* (numa amostra de grupo de bovinos).

No caso dos bovinos, os desparasitantes aplicados foram o Virbamec<sup>®</sup>, Noromectin<sup>®</sup>, Paramectin<sup>®</sup> e Ivomec<sup>®</sup>. Estes constituem soluções injectáveis, cujo princípio ativo é a ivermectina, incluída na classe dos endectocidas, a qual é uma lactona macrocíclica com ação contra nemátodes gastrointestinais, pulmonares e oculares, larvas de muscídeos, ácaros de sarna e piolhos.

Nos pequenos ruminantes foram utilizados os desparasitantes injetáveis (iguais aos usados nos bovinos) e as pastas administradas oralmente. Quase todos os deparasitantes orais empregues têm como princípio ativo os benzimidazóis, entre os quais o Panacur<sup>®</sup> 2,5% (Fenbendazol), o Seponver Plus<sup>®</sup> (mebendazol e closantel) e o Valben<sup>®</sup> (albendazol), sendo o Oramec<sup>®</sup> (ivermectina) a única exceção.

No caso dos suínos utilizou-se o Paramectin<sup>®</sup> (figura 2) e nos equídeos aplicaram-se ivermectinas para o controlo dos parasitas externos e internos, como é o caso do Eqvalan<sup>®</sup>. Perante situações com níveis elevados de oocistos, recorreu-se aos coccidiostáticos, como o diclazuril e o toltrazuril, dependendo dos produtos autorizados para cada espécie.



Figura 2 - Desparasitação de um leitão.

## 2.2) Assistência reprodutiva

Uma parte importante dos serviços prestados pela empresa *VetAI* relaciona-se com a assistência reprodutiva, efetuada tanto em espécies pecuárias como em equinos. Durante o estágio realizado foram acompanhadas 1095 intervenções relacionadas com a reprodução animal, distribuídas basicamente por três espécies, tal como podemos observar no gráfico 2. O número de intervenções efetuadas nos equídeos e ovinos foi muito semelhante, com 400 e 398, respetivamente.

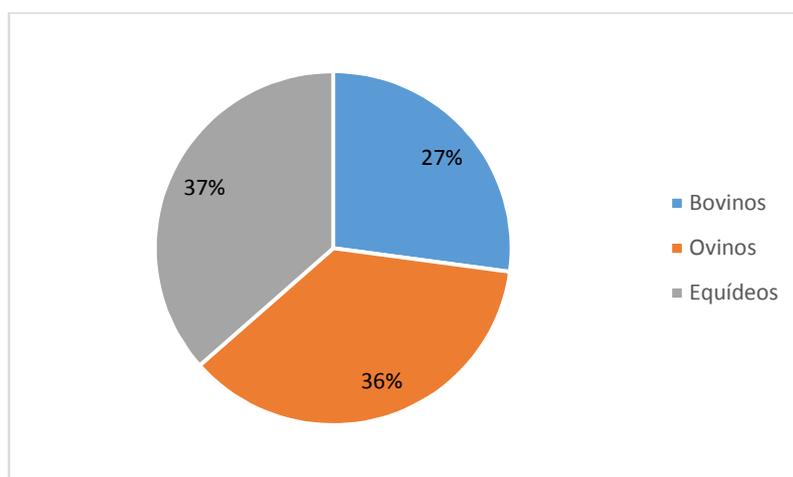


Gráfico 2 - Representação gráfica da distribuição relativa das ações de assistência reprodutiva pelas espécies (n=1095).

### 2.2.1) Espécies pecuárias

Na região de Portalegre a maioria das explorações de bovinos tem aptidão creatopoiética, em que uma forte contribuição para o rendimento das explorações provém da venda de bezerros, pelo que os produtores têm plena consciência da necessidade de obter uma superior eficiência reprodutiva que torne sustentável a exploração no plano económico. Assim, não é de estranhar que um número crescente de produtores solicite serviços ligados à assistência reprodutiva.

No caso dos ovinos, o panorama registado no Alto Alentejo (AA) revela algumas semelhanças com o dos bovinos, já que há uma dominância de unidades com aptidão de produção de carne, estando por isso bastante dependentes da produção e venda de borregos. Apesar disto, os serviços prestados na área da assistência reprodutiva foram quase exclusivamente realizados em explorações de ovinos com aptidão leiteira.

A tabela 4 sumariza as intervenções realizadas nas espécies pecuárias ao longo do estágio.

Tabela 4 - Ações de assistência reprodutiva nas espécies pecuárias, em número absoluto e FR (% , n=695).

Intervenção	Bovinos	Ovinos	Total	FR
Diagnóstico de gestação	201	171	372	53,5%
Exame andrológico	80	77	157	22,6%
Sincronização de estros	16	150	166	23,9%
Total	297	398	695	100,0%
FR	42,7%	57,3%	100,0%	

Pela observação da tabela 4 constata-se que em ambas as espécies a intervenção mais frequente foi o diagnóstico de gestação. Nos bovinos tal diagnóstico foi realizado por palpação transretal e ultrassonografia (figura 3), enquanto nos ovinos o diagnóstico foi efetuado com recurso à ecografia trans-abdominal, normalmente após terem decorrido 45 dias desde a retirada dos carneiros desse grupo de fêmeas.



Figura 3 - Controlo reprodutivo numa vaca, com recurso a ecografia trans-retal.

O exame andrológico (figura 4) também foi uma das intervenções frequentes, mormente em touros. Este exame tem vindo a ser gradualmente mais requisitado, não só pelos produtores que pretendem adquirir touros para as vacadas e querem saber da aptidão do animal para a função de reprodução, mas também pelos produtores que vendem os touros e querem garantir que estes sejam férteis. Porém, as situações em que se realiza o exame andrológico antes do início da época de reprodução, a fim de verificar a capacidade do animal para produzir sémen funcional, não ocorrem com a frequência desejável. De facto, em várias situações foi solicitado o exame apenas na sequência de uma época de reprodução em que as efetivas taxas de fertilidade da vacada foram inferiores aos valores expectáveis.



Figura 4 - Mesa de campo utilizada na realização dos exames andrológicos.

Os gráficos 3 e 4 reproduzem a repartição percentual de touros e carneiros que foram aprovados após a realização do exame andrológico, sendo verificável a similaridade dos valores de aprovação nas duas espécies. Todavia, é relevante referir que, no caso dos carneiros, os animais examinados não são representativos dos efetivos existentes na região do AA, já que os exames andrológicos foram realizados apenas em duas explorações de ovinos de aptidão leiteira respeitantes unicamente à raça *Assaf*. No caso dos touros, a maioria dos exames foram realizados em explorações no distrito de Portalegre, havendo ainda uma limitada porção de indivíduos nas sub-regiões do Baixo Alentejo e Ribatejo. Foram examinados touros de várias raças, entre as quais a *Alentejana*, *Charolesa*, *Limousine* e *Brava de Lide*, pelo que estes resultados asseguram uma maior representatividade do que nos carneiros.

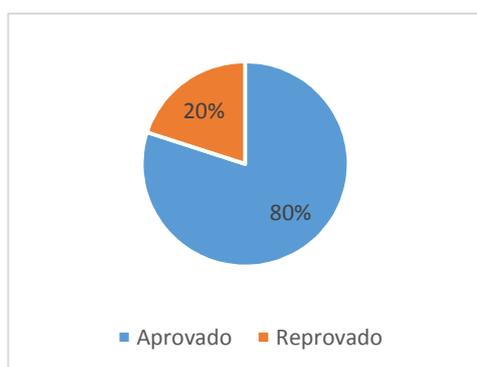


Gráfico 3 - Taxa de aprovação nos exames andrológicos de touros (n=80).



Gráfico 4 - Taxa de aprovação nos exames andrológicos de carneiros (n=77).

A taxa de aprovação obtida para os touros (80%) foi ligeiramente superior aos valores obtidos por Higdon III *et al.* (2000), Kennedy *et al.* (2002) e Romão *et al.* (2012), em que a taxa de aprovação dos touros testados se situava entre 72 e 76,2%.

É essencial referir que dos 80 exames andrológicos realizados em bovinos, sete corresponderam a animais que tinham sido reprovados em exames andrológicos realizados

anteriormente, mas em que os respetivos proprietários optaram por dar uma segunda hipótese ao animal antes de os refugar. Entre as sete repetições, quatro confirmaram resultados insatisfatórios e 3 obtiveram aprovação no segundo teste. Um caso particularmente interessante foi um touro que ao realizar um primeiro exame andrológico não apresentava espermatozoides no ejaculado. Passados cinco meses voltou a testar-se o animal por opção do proprietário. Nesta altura o animal apresentava lesões no escroto (figura 5) e períneo compatíveis com besnoitiose, tendo-se confirmado o diagnóstico laboratorialmente por serologia. Contudo, neste segundo exame o ejaculado apresentava uma mobilidade individual superior a 50%, valor esse suficiente para aprovar o touro como reprodutor.



Figura 5 - Lesão suspeita de besnoitiose no escroto de um touro.

A besnoitiose, provocada pelo protozoário *Besnoitia besnoiti*, tem natureza endémica na região do Alentejo. Os bovinos são hospedeiros intermediários do ciclo e os insetos hematófagos são vetores de transmissão, podendo a infeção ser assintomática, aguda ou crónica. Um sinal clínico patognomónico é revelado pela presença de múltiplos quistos na esclera, embora o que se observe com maior frequência sejam áreas de alopecia, espessamento cutâneo e hiperqueratose, muitas vezes na zona perineal e escrotal (Cortes *et al.*, 2006).

Os elevados prejuízos para os produtores devem-se, não apenas à dimensão da taxa de mortalidade associada (cerca de 10%), mas sobretudo à infertilidade ou esterilidade que afeta os machos e aos abortos que causa nas fêmeas (Cortes *et al.*, 2006). Ao longo do estágio foram detetados 4 animais (3 machos e uma fêmea) com lesões suspeitas de besnoitiose, tendo-se confirmado o diagnóstico através de serologia com identificação de anticorpos, não obstante a técnica de diagnóstico de eleição ser a biópsia cutânea das lesões. O facto de não existir um tratamento eficaz contra a besnoitiose leva a recomendar aos produtores a eliminação dos animais infetados, a fim de prevenir a transmissão a outros animais da vacada.

Os gráficos 5 e 6 exibem a proporção relativa das causas de reprovação para as duas espécies. Como é possível observar, o motivo mais frequente de reprovação, quer em touros quer em carneiros, foi a ausência de espermatozóides no ejaculado.

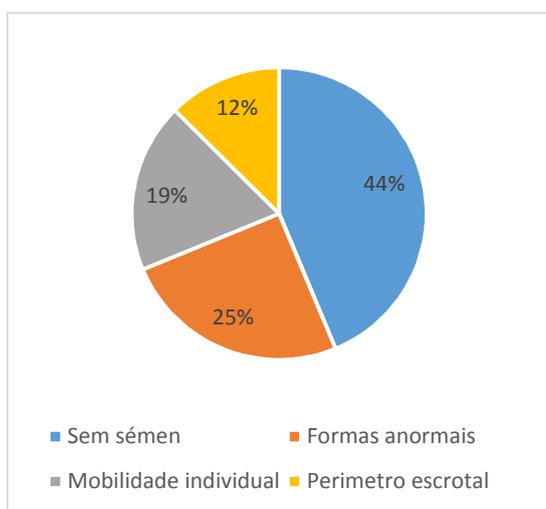


Gráfico 6 - Representação gráfica dos motivos de reprovação dos exames andrológicos de touros (n=16).

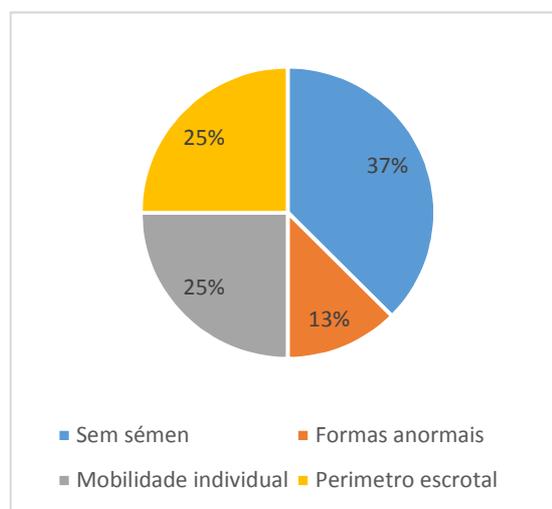


Gráfico 5 - Representação gráfica dos motivos de reprovação dos exames andrológicos de carneiros (n=16).

O protocolo de sincronização de estros utilizado nos ovinos consistiu na colocação intravaginal de esponjas Chronogest<sup>®</sup>, cujo princípio ativo é o acetato de flurogestona, análogo sintético da progesterona. As esponjas eram retiradas depois de 12 a 14 dias, administrando-se nessa altura a gonadotropina coriônica equina (eCG) que possui o mesmo tipo de atividade biológica da hormona foliculo estimulante (FSH). A sua ação desencadeia o aparecimento do cio e da ovulação, introduzindo-se o macho junto das ovelhas 48 horas após a remoção das esponjas.

### 2.2.2) Equídeos

Na tabela 5 encontram-se resumidas as intervenções relacionadas com a assistência reprodutiva realizadas nos equídeos. Como é possível constatar, as intervenções foram realizadas quase que exclusivamente nos equinos.

Tabela 5 - Ações de assistência reprodutiva em equídeos, em número absoluto e FR (%), n=400).

Intervenção	Equinos	Asininos	Total	FR
<b>Controlo reprodutivo</b>	274	12	286	71,5%
<b>Inseminação artificial</b>	47	0	47	11,8%
<b>Manipulação farmacológica</b>	31	0	31	7,7%
<b>Colheita de sémen</b>	28	2	30	7,5%
<b>Lavagem uterina</b>	4	0	4	1,0%
<b>Exame andrológico</b>	2	0	2	0,5%
<b>Total</b>	386	14	400	100,0%
<b>FR</b>	96,5%	3,5%	100,0%	

A atividade efetuada com maior frequência foi o controlo reprodutivo, que consistiu na realização de diagnósticos de gestação e determinação da fase do ciclo éstrico, sendo ambos concretizados por palpação e ecografia transretais (figura 6). Entre os critérios usados na determinação da fase do ciclo éstrico destacam-se a dimensão e consistência dos folículos ovários e a tonicidade do útero e cérvix. Os diagnósticos de gestação normalmente eram realizados 15 a 16 dias após a inseminação, podendo, em determinadas circunstâncias, ser realizados antes, já que a vesícula embrionária pode ser detetada no útero entre os dias 10-12 após a ovulação (Blanchard *et al.*, 2003), existindo, contudo, maior probabilidade de obter um diagnóstico inconclusivo nesta fase.



Figura 6 - Controlo reprodutivo numa burra, com recurso a ecografia trans-retal.

Entre o conjunto das inseminações artificiais, 34 foram realizadas com sémen fresco, 9 com sémen refrigerado e apenas 4 com sémen congelado. O gráfico 7 representa a proporção relativa de cada tipo de sémen utilizado nas inseminações artificiais.

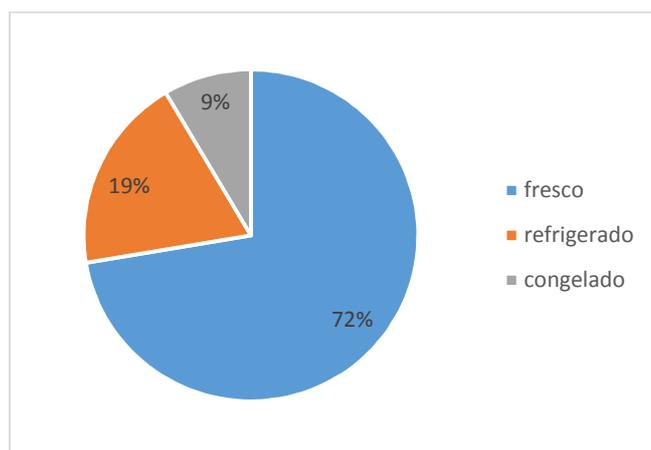


Gráfico 7 - Representação gráfica do tipo de sémen utilizado nas inseminações (n=47).

Por norma, as inseminações com sémen fresco e refrigerado são realizadas antes de ocorrer a ovulação, desde que estejam presentes os sinais que indiquem a sua iminência. Assim, a ovulação deve ser detetada nas 24 horas seguintes à inseminação, no caso do sémen refrigerado, ou 48 horas para inseminações com sémen fresco (Blanchard *et al.*, 2003). Uma

técnica utilizada para controlar a viabilidade do sémen é guardar uma amostra do mesmo, em local protegido da luz, e observá-la regularmente ao microscópio.

As inseminações com sémen congelado só costumam realizar-se após ocorrer a ovulação, não só pela curta longevidade dos espermatozoides, mas também devido ao elevado custo de cada dose. Tal situação obriga a que a égua seja controlada com maior frequência, normalmente com intervalos de 6 horas, até que seja detetada a ovulação (Blanchard *et al.*, 2003).

No que respeita ao processo de manipulação farmacológica do ciclo éstrico foram realizadas 17 administrações de Chorulon<sup>®</sup>, cujo princípio ativo é a gonadotropina coriónica humana (hCG), 10 administrações de Facilpart<sup>®</sup> (ocitocina) e 4 administrações de Estrumate<sup>®</sup> (análogo da PGF<sub>2α</sub>). A administração de hCG desempenha a mesma função biológica da hormona luteinizante (LH), induzindo a ovulação 36 a 48 horas após a sua administração. O uso da ocitocina justificava-se nas situações em que havia presença exagerada de líquido intrauterino durante o estro. A sua utilização pretendia aumentar as contrações uterinas de tal forma que facilitasse a drenagem desse líquido. A administração de um análogo da PGF<sub>2α</sub> tinha o objetivo de promover o aparecimento do estro em éguas que se encontravam em diestro, através indução da luteólise, não podendo ser utilizada nos primeiros cinco dias após a ovulação.

As colheitas de sémen realizaram-se com recurso a uma vagina artificial modelo *Colorado*. A ejaculação do garanhão ocorre em resposta a pressão, fricção e temperatura adequadas, proporcionadas pela vagina artificial que está preparada e devidamente lubrificada com gel não espermicida. Tanto a temperatura da vagina como o volume de água, que têm influência direta na pressão conferida, dependem da preferência individual do garanhão (Crabtree, 2010). Algumas colheitas foram realizadas com recurso a um manequim artificial (figura 7), enquanto noutras foram utilizadas éguas que evidenciavam sinais de cio.



Figura 7 - Colheita de sémen num garanhão, com recurso a um manequim.

Antes de se iniciar a inseminação realizavam-se alguns procedimentos de rotina para avaliar determinadas características do sémen, designadamente o volume e a mobilidade individual. Nos exames andrológicos realizados ainda se efetuava uma coloração da amostra com o corante eosina-necrosina (para observação da morfologia individual e aferição da viabilidade

espermática) e avaliação da concentração espermática, com recurso à câmara de *Neubauer* melhorada.

O sémen era posteriormente sujeito a um processo de centrifugação, durante 10 minutos a 1000 rotações por minuto. Posteriormente desprezava-se o sobrenadante e aplicava-se o diluidor numa proporção de 1:5. Cada dose inseminante tinha entre 10 e 20 ml.

As lavagens uterinas foram realizadas em éguas com uma exagerada quantidade de líquido no útero. Como esta acumulação costuma estar associada a infeções subclínicas, realiza-se também antibioterapia intrauterina. O antibiótico aplicado foi a gentamicina, a qual, devido à ação irritante que provoca nas mucosas, necessita de ser administrada juntamente com uma solução tampão, como é o caso do bicarbonato de sódio.

### 2.3) Patologia clínica

As 282 intervenções de clínica distribuíram-se pelos bovinos (139 casos), pequenos ruminantes (53 casos) e equídeos (90 casos). O gráfico 8 apresenta a importância relativa de cada uma destas espécies.

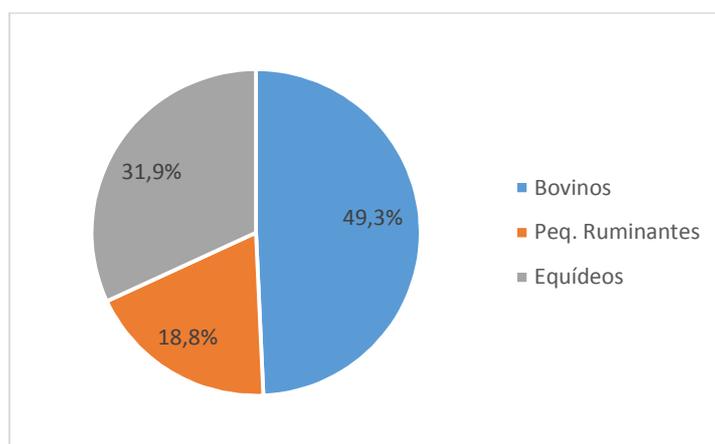


Gráfico 8 - Representação gráfica da distribuição relativa das ações de clínica pelas espécies (n=282).

#### 2.3.1) Clínica de bovinos

Entre as várias espécies pecuárias, os bovinos são aqueles em que a medicina individual tem maior expressão, essencialmente devido ao elevado valor comercial de cada animal. Como é possível verificar através do gráfico 9, o domínio com maior número de intervenções foi a neonatologia, seguida do sistema reprodutor, respiratório, digestivo, musculoesquelético e, por último, a pele e anexos. Certos casos clínicos, não enquadráveis em qualquer das áreas anteriormente referidas, foram agrupados na categoria designada outros casos.

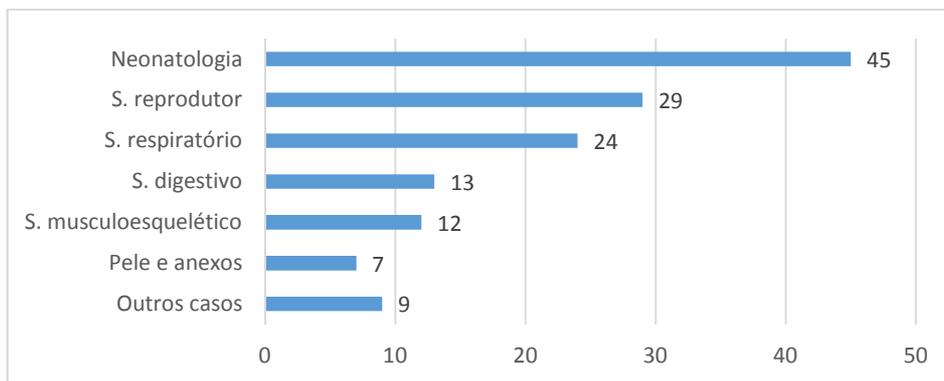


Gráfico 9 - Distribuição da casuística de clínica, em bovinos, pelo sistema envolvido, em número absoluto (n=139).

### 2.3.1.1) Neonatologia

A saúde dos vitelos requer bastantes cuidados dos proprietários das unidades pecuárias, já que estes têm implicação direta na fonte de receita dessas explorações através da venda de vitelos. Nestas explorações a mortalidade dos vitelos, antes de serem desmamados, pode variar entre os 3 e 7%, sendo a incidência muito superior em animais descendentes de vacas primíparas. As principais causas de mortalidade são a distócia, diarreia neonatal e infeção respiratória (Radostitis, 2007a).

A neonatologia foi a área clínica com maior número de casos acompanhados. Como expressa a tabela 5, os 45 casos clínicos distribuíram-se por vitelos com diarreia neonatal, doença respiratória, falha de transferência da imunidade passiva e onfalite.

Tabela 6 - Casos clínicos em neonatologia, em número absoluto e FR (%), n=45).

Caso clínico	Nº animais	FR
Diarreia neonatal	28	62,2%
Doença respiratória	7	15,6%
Falha de transferência da imunidade passiva	5	11,1%
Onfalite	5	11,1%
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>100,0%</b>

A diarreia neonatal constitui a primeira causa de mortalidade em vitelos, tendo por isso um impacto negativo na rentabilidade económica das explorações. Além da mortalidade, ocorrem ainda graves prejuízos associados aos custos de tratamento e aos atrasos no crescimento dos animais. A diarreia neonatal é uma doença multifatorial, cuja etiologia envolve uma interação entre várias bactérias, vírus e protozoários, sendo os mais recorrentes a *Escherichia coli*, o rotavírus, o coronavírus e o *Cryptosporidium parvum*, variando a sua importância com a idade do vitelo. Alguns fatores ambientais, como a dieta e o manejo desempenham também papel proeminente no aparecimento da doença (Bettencourt & Romão, 2013).

Torna-se complexo diagnosticar com rigor quais os agentes etiológicos envolvidos, devido à inespecificidade dos sinais clínicos, que são diarreia aquosa profusa, acidose e desidratação progressiva. Na maioria dos casos os produtores não estão disponíveis para pagar um exame laboratorial para se chegar ao diagnóstico etiológico. No entanto, em alguns surtos isso seria vantajoso já que existem terapêuticas específicas para alguns dos agentes (Bettencourt & Romão, 2013).

O tratamento implementado nos vários casos acompanhados consistiu em fluidoterapia oral e/ou IV (intra-venosa), sendo por vezes acompanhada de um suplemento dietético (Diaproof K<sup>®</sup>), o qual auxilia na reidratação e correção do desequilíbrio ácido-base. A seleção do antibiótico depende basicamente da idade do animal e do aspeto da diarreia, tendo-se utilizado ampicilina (Albipen<sup>®</sup>LA), na dose de 10 mg/kg, gentamicina (Gentayet<sup>®</sup>), na dose de 5 mg/kg, ou uma associação de sulfadiazina e trimetropim (Trivetrim<sup>®</sup>), na dose de 30 mg/kg. Em muitas situações, eventualmente não justificaria a aplicação de antibioterapia. No entanto a incerteza sobre a ingestão de colostro, bastante comum no maneio extensivo, recomenda a sua administração. Em situações de hipertermia também se utilizou um anti-inflamatório, como o flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>), na dose de 2,2 mg/kg. Nas amostras enviadas para laboratório houve isolamento de rotavírus ou de estirpes enterotoxigênicas de *E. coli*.

No período neonatal é frequente o desenvolvimento de doenças que envolvam o sistema respiratório, sendo usual a ocorrência de pneumonia bacteriana, que pode ser predisposta por agentes virais. Por vezes, a doença respiratória ocorre quando o pulmão não consegue transitar de um órgão colapsado e preenchido por líquido para uma estrutura preenchida por ar, responsável pelas trocas gasosas de todo o corpo. Mesmo quando os pulmões têm características normais no nascimento, a doença pulmonar pode ocorrer devido a septicémia, pneumonia por aspiração ou contaminação ambiental (House & Gunn, 2008).

O tratamento destes casos consistiu na aplicação de antibioterapia com boa atuação a nível pulmonar, como por exemplo a tulatromicina (Draxxin<sup>®</sup>), na dose de 2,5 mg/kg, ou o florfenicol (Nufloor<sup>®</sup>), na dose de 20 mg/kg, e terapia anti-inflamatória com meloxicam (Meloven<sup>®</sup>), na dose de 0,5 mg/kg. Quando se revelou necessário, também se instituiu fluidoterapia e suplementação com um complexo multivitamínico.

O termo onfalite é a designação da inflamação das estruturas umbilicais, as quais incluem as artérias umbilicais, a veia umbilical, o úraco e os tecidos envolventes. Como o umbigo é uma importante porta de entrada para o organismo, a infeção local de qualquer uma destas estruturas pode ser responsável pelo desencadear de septicémia. A fonte de infeção pode ser a contaminação ambiental, desde que associada a uma falha de transferência da imunidade passiva. Os agentes bacterianos isolados em vitelos com onfalite são *E. coli*, *Actinomyces pyogenes*, *Proteus* e *Enterococcus* (House & Gunn, 2008).

Os sinais clínicos mais comuns são transmitidos pelo aumento da dimensão do umbigo e pela drenagem de material purulento. O aparecimento de sinais sistémicos, como artrite, diarreia ou pneumonia, pode ocorrer em menos de 24 horas (House & Gunn, 2008).

O tratamento dos casos por nós acompanhados consistiu na limpeza do umbigo com água oxigenada e aplicação de spray de alumínio (Aluspray<sup>®</sup>). Quando já estavam presentes sinais sistêmicos, realizava-se também antibioterapia, com uma associação de penicilina e estreptomicina (Pendistrep<sup>®</sup>), respetivamente na dose de 20000 UI/kg e 20 mg/kg, ou gentamicina (Gentayet<sup>®</sup>), e terapia anti-inflamatória com flunixine meglumine (Niglumine<sup>®</sup>). Em dois vitelos foi possível observar artrite evidente nos membros posteriores.

A falha de transferência da imunidade passiva ocorre quando não há ingestão de colostro ou ainda quando não existe capacidade de absorção intestinal. Os vitelos nascem quase sem quaisquer quantidades de imunoglobulinas circulantes, pelo que é de extrema relevância a ingestão do colostro materno nas primeiras horas pós-parto. Assim, a falha de transferência de imunidade passiva nos vitelos aumenta bastante a suscetibilidade a infeções no período neonatal (House & Gunn, 2008).

No sistema de manejo extensivo é difícil assegurar que os vitelos ingeriram o colostro nas primeiras horas de vida. As situações acompanhadas corresponderam a animais recém-nascidos que apresentavam sinais como a depressão, fraqueza e anorexia, e na maioria das vezes as progenitoras eram primíparas que rejeitaram os vitelos á nascença. A terapia instituída consistia na reidratação do animal e em tratamento de suporte para correção de problemas secundários como a hipoglicémia, desequilíbrios eletrolíticos e/ou acidose metabólica.

#### 2.3.1.2) Sistema reprodutor

O sistema que registou um maior número de ocorrências em bovinos adultos foi o sistema reprodutor. A observação da tabela 7 permite constatar que a distócia foi o caso clínico mais frequente, seguida da retenção de membranas fetais (RMF), prolapso uterino, prolapso vaginal, mastite e metrite.

Tabela 7 - Casos clínicos envolvendo o sistema reprodutor de bovinos, em número absoluto e FR (%), n=29).

Caso clínico	Nº animais	FR
Distócia	16	55,2%
RMF	5	17,2%
Prolapso uterino	4	13,8%
Prolapso vaginal	2	6,8%
Mastite	1	3,5%
Metrite	1	3,5%
Total	29	100,0%

Distócia é a dificuldade na evolução normal do parto e classicamente pode ter origem maternal ou fetal. A abordagem a estes casos inicia-se com a anamnese, seguindo-se a limpeza da região perineal e vulvar. Posteriormente realiza-se o exame vaginal através de palpação, o qual tem como principais propósitos determinar qual a localização do feto e qual a sua

apresentação, postura e posição, bem como monitorizar a presença ou ausência de sinais vitais. Avalia-se ainda o grau de dilatação da cérvix e determina-se a eventual existência de alguma fratura, torção uterina ou outra lesão que interfira com o parto (Noakes, 2009a).

Entre os 16 casos de distócia acompanhados, apenas foi possível realizar a extração do vitelo com vida em sete dos partos. Na maioria das situações a retirada do vitelo foi conseguida com recurso ao extrator obstétrico. Todavia, em quatro situações foi necessário recorrer à cesariana para retirar o vitelo (figura 8).



Figura 8 - Cesariana numa vaca.

As causas das várias distócias presenciadas encontram-se descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Causas de distócia, em número absoluto e FR (%; n=16).

Causa	Nº casos	FR
<b>Desproporção feto-maternal</b>	7	43,8%
<b>Defeito na apresentação, posição ou postura</b>	4	25,0%
<b>Inércia uterina</b>	3	18,7%
<b>Insuficiente dilatação cervical</b>	2	12,5%
<b>Total</b>	16	100,0%

A desproporção feto-maternal foi a causa mais frequentemente observada, sendo a situação em que existe incompatibilidade entre o desenvolvimento do feto e o canal obstétrico, pelo que a vaca não consegue ou tem grandes dificuldades em completar a segunda fase do parto (Noakes, 2009b). Normalmente era patente que os vitelos eram excessivamente grandes, quando comparado com a dimensão da progenitora. Em alguns casos observavam-se os membros anteriores do feto já exteriorizados da vulva da vaca mas, não sendo possível a passagem da cabeça do feto, era por vezes necessário realizar uma episiotomia.

A maior parte dos partos desta categoria ocorreu em novilhas primíparas que provavelmente foram postas à cobrição demasiado cedo, não dando tempo à novilha para completar o seu

desenvolvimento. Também se constatou que as vacas de raças autóctones que apresentaram distócia por desproporção feto-maternal foram cobertas por touros de raças exóticas, como a limousine e a charolesa, as quais são entendidas como responsáveis por uma incidência de distócia superior (Noakes, 2009a). O problema poderia ser minimizado se a escolha do touro fosse feita após considerar a tendência no peso ao nascimento dos vitelos.

A segunda causa mais comum de distócia foi o defeito na apresentação ou na postura. Em duas situações o vitelo tinha uma apresentação posterior, em outra tinha um desvio lateral da cabeça e houve, ainda, um vitelo com uma flexão unilateral do carpo. Porém, em todos estes casos foi possível extrair o feto com recurso ao extrator obstétrico, após correção do defeito de postura que originou a distócia.

A RMF é definida como a incapacidade de expulsão das membranas fetais nas 24 horas após o parto. Se a separação das membranas fetais ocorre durante o período fisiológico significa que a progressão da involução uterina está a decorrer dentro da normalidade. A colagenase, que é secretada pelas membranas fetais durante o parto, tem a função de induzir a proteólise dos cotilédones que, a par das contrações uterinas e da compressão dos placentomas, permitem o destacamento entre as carúnculas maternas e os cotilédones fetais (Eiler & Fecteau, 2007). Qualquer alteração deste processo pode levar à RMF. Entre os principais fatores de risco destacam-se a ocorrência de aborto, distócia, partos gemelares, desequilíbrios hormonais e deficiências em selénio e vitamina E (Eiler & Fecteau, 2007).

Nos casos de RMF observados, as vacas apresentavam parte das membranas fetais no exterior. A remoção manual era realizada através de tração suave, na tentativa de soltar os cotilédones das carúnculas. A antibioterapia local consistia em pessários intrauterinos de rifaximina (Fatroximín®) e a sistémica em oxitetraciclina (Solmycin®), por via intramuscular, na dose de 20 mg/kg, procurando evitar a ocorrência de metrite. Usava-se ainda um análogo da PGF<sub>2α</sub> (Estrumate®), de forma a estimular a contractilidade uterina e promover a expulsão das membranas fetais que não puderam ser tracionadas.

O prolapso uterino é uma complicação frequente na terceira fase do parto, ocorrendo nas primeiras horas após o parto. Ainda que a etiologia não esteja completamente esclarecida, sabe-se que se há uma interação entre as fortes contrações abdominais, a inércia uterina e a flacidez dos tecidos envolventes, tendo como fatores predisponentes a distócia, a RMF e a hipocalcémia. A frequência desta afeção é muito superior em vacas múltiparas e com aptidão leiteira (Noakes, 2009c).

O tratamento implementado envolveu a redução do útero prolapsado, após lavagem com água e solução antisséptica, utilizando-se uma tábua para suportar o útero e facilitar a recolocação. A administração local de ocitocina facilita a regressão uterina. Após reintroduzir o útero e garantir que nenhuma das suas partes ficava invertida, realizava-se a sutura de *Bunner*, a fim de evitar recidivas. O tratamento aplicado consistia ainda em antibioterapia, com o uso de oxitetraciclina (20 mg/kg), e terapia anti-inflamatória, com recurso a flunixin meglumine (2,2 mg/kg). Em

vacas que tinham perdido uma quantidade de sangue considerável também se realizava fluidoterapia e suplementação com ferro (Suplefer®).

#### 2.3.1.3) Sistema respiratório

O sistema respiratório foi daqueles que incluiu um maior número de intervenções, tendo sido tratados 24 animais. A sintomatologia apresentada pelos animais permitiu classificar esses casos como síndrome respiratória bovina (SRB).

A SRB tem uma etiologia multifatorial que, apesar de envolver diferentes agentes infecciosos, apresenta sinais clínicos muito semelhantes, os quais requerem as mesmas medidas preventivas e terapêuticas. Ainda que os agentes virais possam desempenhar um importante papel na patogenia da doença em infecções mistas devido a ação sinérgica, são as bactérias as principais responsáveis pelo aparecimento de pneumonia, destacando-se a *Manheimia haemolytica*, a *Pasteurella multocida*, o *Histophilus somni* e o *Mycoplasma bovis* (Stilwell, 2013).

Todas estas bactérias são comensais na nasofaringe, embora determinados fatores como a introdução de estirpes patogênicas, a presença de infecções virais concomitantes, a quebra de resistência do hospedeiro ou o acesso ao trato respiratório inferior, possam despoletar o aparecimento da SRB. Os principais vírus associados a esta patologia são o IBRV, o BVDV, o BRSV, o PI-3 e o coronavírus. Certos fatores como o *stress* também predispoem o aparecimento desta síndrome. A imunodepressão causada facilitará tanto a ação nefasta dos agentes infecciosos como de determinados fatores ambientais, como a ventilação, a temperatura ou a densidade populacional (Stilwell, 2013).

A SRB tem especial importância em explorações que usam o sistema intensivo, onde ocorre uma agregação de animais provenientes de diversas origens, pertencentes a distintas raças, com diferentes idades, pesos e estados imunitários. Esta situação de conjugação de aspetos de natureza divergente causa bastante *stress* aos animais, tornando-os mais suscetíveis e, ao mesmo tempo, há um maior risco de exposição, devido à presença de microrganismos com proveniências díspares. Esta síndrome causa avultados prejuízos económicos nas explorações, devido a custos de tratamento, quebra no ganho do peso diário, mortalidade, refugo e depreciação da qualidade da carne no matadouro. Independentemente dos agentes etiológicos envolvidos, os sinais clínicos frequentemente presentes são a tosse, a taquipneia, o corrimento nasal muco-purulento, a anorexia, a depressão, o isolamento e a pirexia (Stilwell, 2013).

Praticamente todos os casos de SRB acompanhados corresponderam a bezerros em unidades de engorda, recentemente transportados desde um leilão. A terapia antimicrobiana implementada constou de tularomicina (2,5 mg/kg) ou florfenicol (20 mg/kg), sendo que ambos evidenciam um espetro adequado e uma boa atuação a nível pulmonar e nas secreções brônquicas. Usou-se também o anti-inflamatório meloxicam (Meloven®) e, em animais com

sinais clínicos mais exuberantes, administrou-se também bromexina (Quentan<sup>®</sup>), a qual revela uma ação mucolítica e broncodilatadora. Para lá do tratamento referido, também foram feitas recomendações aos produtores quanto ao cumprimento do programa vacinal, maior controlo dos animais transportados e relativamente ao manejo geral da exploração.

#### 2.3.1.4) Sistema digestivo

Durante o estágio foram acompanhados 13 casos com sede no sistema digestivo, sendo que a afeção mais frequente foi a indigestão simples, seguida da diarreia, timpanismo gasoso e timpanismo espumoso (tabela 9).

Tabela 9 - Casos clínicos envolvendo o sistema digestivo de bovinos, em número absoluto e FR (%), n=13).

Caso clínico	Nº animais	FR
Indigestão	6	46,2%
Diarreia	4	30,8%
Timpanismo gasoso	2	15,4%
Timpanismo espumoso	1	7,6%
Total	13	100,0%

Indigestão é o termo normalmente utilizado para designar as disfunções retículo-ruminais, as quais podem ser primárias ou secundárias dependendo da sede da afeção. As indigestões primárias normalmente observam-se em associação com um distúrbio alimentar, por exemplo devido à ingestão de alimentos deteriorados ou após uma transição alimentar demasiado repentina (Stilwell, 2013). Os casos clínicos observados foram originados por uma alteração brusca no regime alimentar, em casos em que os bovinos foram mudados para uma cerca onde tinham à disposição elevada quantidade de bolota, alimento que aparentemente é preferido em relação às restantes matérias-primas. Estas alterações introduzem novos substratos à flora ruminal para os quais os microrganismos não revelam a suficiente adaptação. O tratamento passou pela entubação nasogástrica (com aplicação de fluidos e de sulfato de magnésio) e pela suplementação com Catosal<sup>®</sup> (complexo multivitamínico) IV. Adicionalmente, restringiu-se o acesso à cerca onde os animais ingeriram bolotas e forneceu-se feno em elevada qualidade.

A diarreia corresponde a um aumento da frequência de defecação associada à diminuição da consistência das fezes. As causas mais frequentes de diarreia são a secreção excessiva de fluidos para o interior do lúmen intestinal, a redução da capacidade de absorção de fluidos, a inflamação da parede intestinal ou o aumento do peristaltismo. Embora a disenteria seja um sinal clínico comum a várias doenças de bovinos, também pode ter etiologia não patológica, como nas situações de *stress* (Radostitis, 2007b).

O tratamento dos casos de diarreia que acompanhámos foi realizado através de fluidoterapia oral ou IV, de ampicilina (Albipen<sup>®</sup> LA), na dose de 10 mg/kg, de flunixin meglumine

(Niglumine<sup>®</sup>), na dose de 2,2 mg/kg, e de um complexo multivitamínico (Duphalyte<sup>®</sup>). Em todas as situações de diarreia acompanhadas realizou-se um exame coprológico, para averiguar a possibilidade de a diarreia ser causada por parasitas gastrointestinais.

#### 2.3.1.5) Sistema musculoesquelético

Os casos de doença do sistema musculoesquelético corresponderam a ocorrências de claudicação e da síndrome da vaca caída (tabela 10).

Tabela 10 - Casos clínicos envolvendo o sistema musculoesquelético de bovinos, em número absoluto e FR (%), n=12).

Caso clínico	Nº animais	FR
Claudicação	8	66,7%
Síndrome vaca caída	4	33,3%
Total	12	100,0%

Os casos de claudicação observados resultaram de traumas, muitos deles devido a conflitos entre animais. O tratamento baseava-se em terapia anti-inflamatória, quer usando um AINE ou um córticoesteróide. Numa situação de claudicação foi possível retirar uma agulha que um bezerro tinha espetada na extremidade podal, tendo-se nessa situação administrado também oxitetraciclina, pela possibilidade de infeção.

A síndrome da vaca caída tem como características fundamentais o decúbito prolongado que provoca incapacidade em o animal se erguer. Ainda que possa ocorrer a qualquer momento, é mais recorrente no pós-parto, particularmente em vacas primíparas devido à compressão que o feto exerceu sobre o nervo obturador. Independentemente da causa primária que motiva a permanência em decúbito, que pode ser sistémica ou local, o animal está sujeito a desenvolver lesão muscular e/ou nervosa, que poderá tornar-se a razão da incapacidade do animal se levantar, mesmo que o motivo inicial seja corrigido (Bettencourt & Romão, 2013).

Entre os quatro casos acompanhados, três vacas tinham parido recentemente e a outra estava gestante. O tratamento consistiu primariamente em tentar erguer o animal com auxílio duma pinça de ancas (figura 9), de forma a reduzir a possibilidade de desenvolvimento de lesões irreversíveis. Sabia-se à partida que este procedimento requeria persistência e paciência, deixando esse facto bem patente ao produtor para que ele tivesse plena consciência de que o sucesso do tratamento dependeria fundamentalmente da sua dedicação e empenho. Aconselhava-se também o fornecimento de alimento de boa qualidade, bem com uma cama confortável e não escorregadia, para ajudar o animal a levantar-se. Realizou-se fluidoterapia oral e administrou-se um complexo multivitamínico (Catosal<sup>®</sup>) e um corticoide, a dexametasona (Vetacort<sup>®</sup>) na dose de 0,15 mg/kg, com exceção da vaca gestante em que se utilizou um AINE, flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>).



Figura 9 - Elevação de uma vaca caída, com recurso a uma pinça de ancas.

#### 2.3.1.6) Pele e anexos

No decurso do estágio foram acompanhados sete casos referentes à pele e anexos, entre tratamento de feridas, abscessos e necrobacilose interdigital (tabela 11).

Tabela 11 - Casos clínicos da área pele e anexos de bovinos, em número absoluto e FR (%; n=7).

Caso clínico	Nº animais	FR
<b>Ferida</b>	3	42,8%
<b>Abscesso</b>	2	28,6%
<b>Necrobacilose interdigital</b>	2	28,6%
<b>Total</b>	7	100,0%

O tratamento efetuado nas feridas consistiu na sua lavagem com uma solução antisséptica. Nos abscessos subcutâneos procedeu-se à sua drenagem, tendo-se aplicado água oxigenada posteriormente. Uma das feridas traumáticas correspondeu a uma perfuração na parede abdominal num touro de raça brava de lide, resultante de uma cornada de outro animal. Nessa situação foi necessário suturar com um fio absorvível (Catgut Chrom<sup>®</sup>), após sedar o animal com xilazina (Rompun<sup>®</sup>). Sempre que necessário realizou-se também antibioterapia, como uma associação de penicilina e estreptomina (Pendistrep<sup>®</sup>) ou oxitetraciclina, e anti-inflamatória, com flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>).

A necrobacilose interdigital caracteriza-se pela inflamação e necrose dos tecidos moles do espaço interdigital, estando normalmente associada ao excesso de humidade e a deficientes condições higiénicas do piso. A etiologia da doença está ligada ao *Fusobacterium necrophorum*, mas a ação sinérgica com outros agentes bacterianos, como a *Prevotella melanogenicus* ou o *Dichelobacter nodosus*, facilitam o estabelecimento da infeção (Radostitis, 2007c). O tratamento consistiu na antibioterapia com oxitetraciclina (20 mg/kg).

### 2.3.1.7) Outros casos

Além dos casos já mencionados, foram ainda acompanhados seis casos de hemoparasitose e três de queratoconjuntivite (tabela 12).

Tabela 12 - Número absoluto e FR (%; n=9) de outros casos clínicos acompanhados na espécie bovina.

Caso clínico	Nº animais	FR
Hemoparasitose	6	66,7%
Queratoconjuntivite	3	33,3%
Total	9	100,0%

A comumente designada febre da carraça é uma hemoparasitose que tem como agentes etiológicos mais frequentes hemoparasitas dos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Anaplasma*, todos veiculados por ixodídeos. Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos são hipertermia, anemia, icterícia e hemoglobinúria (Antunes, 2008). O diagnóstico pode ser realizado através de serologia ou por um esfregaço sanguíneo, tendo em dois dos seis casos observados sido identificada a presença de *Babesia* no esfregaço sanguíneo. Nos restantes casos não foi possível determinar o agente etiológico.

A terapêutica implementada nos casos acompanhados consistiu na aplicação de oxitetraciclina (Solmycin<sup>®</sup>), a qual tem ação sobre a *Anaplasma marginale*, e imidocarb (Imizol<sup>®</sup>), atuando contra a *Babesia*. Administrou-se também flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>), a fim de atenuar o desconforto abdominal causado pelo imidocarb, e uma suplementação com ferro (Suplefer<sup>®</sup>) nos casos de anemia muito acentuada. Nesta situação não se podia usar a oxitetraciclina, por ser quelante do ferro.

Os casos de lesões oculares, originados potencialmente por traumatismo, apresentavam sinais de queratoconjuntivite. A terapêutica consistiu em lavagem do globo ocular, seguida de aplicação tópica de prednisolona (Predniftalmina<sup>®</sup>) e oxitetraciclina. Antes da aplicação dos fármacos aplicou-se fluoresceína no globo ocular para descartar a presença de úlcera, devido à utilização do córticoesteróide.

### 2.3.1.8) Outros procedimentos

Foram ainda realizadas seis necrópsias e duas eutanásias. As causas de morte identificadas na necrópsia foram septicémia (em dois bezerros e numa vaca adulta), traumatismo (num bezerro e numa vaca adulta) e leptospirose (num bezerro).

Em relação a exames complementares, os exames serológicos e coprológicos foram os que tiveram maior expressão (gráfico 10).

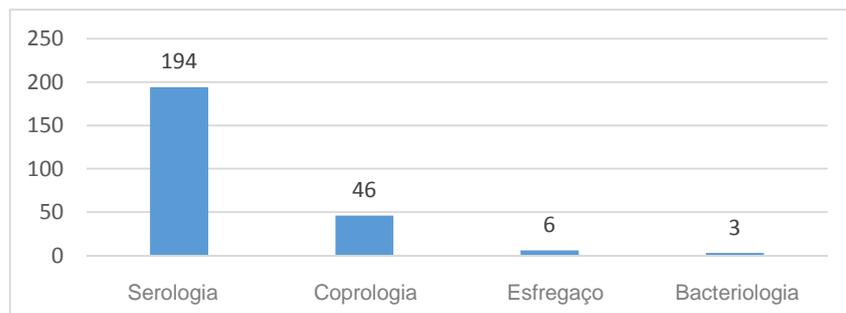


Gráfico 10 - Exames complementares na espécie bovina, em número absoluto (n=139).

Entre os 194 exames serológicos realizados, 136 foram para deteção de paratuberculose, 54 para pesquisa de IBR e/ou BVDV e os restantes quatro para diagnóstico de besnoitiose.

### 2.3.2) Clínica de pequenos ruminantes

Os casos clínicos acompanhados no que aos pequenos ruminantes diz respeito, tiveram menor expressão quando comparados com os casos assistidos em bovinos, devido ao reduzido valor económico que cada animal representa. A quantidade de intervenções na espécie ovina foi substancialmente superior à regista na espécie caprina. Os múltiplos casos clínicos seguidos em ovinos encontram-se referidos na tabela 13.

Tabela 13 - Casos clínicos de ovinos, em número absoluto e FR (%), n=45).

Caso clínico	Nº animais	FR
Ferida	33	73,4%
Distócia	6	13,3%
Prolapso uterino	2	4,5%
Diarreia	1	2,2%
Intoxicação	1	2,2%
Urolitíase	1	2,2%
Internamento	1	2,2%
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>100,0%</b>

A intervenção realizada num maior número de animais foi o tratamento de feridas, em 33 ovinos pertencentes a dois rebanhos que foram atacados por canídeos. A terapêutica seguida passou pela limpeza e desinfeção das feridas com solução antisséptica e a posterior administração de amoxicilina (Clamoxyl®LA) e flunixin meglumine (Niglumine®). Foi necessário internar um borrego que perdeu a capacidade de locomoção, tendo recuperado após vários dias a receber de fluidoterapia IV e demais cuidados de suporte.

As intervenções relacionadas com o sistema reprodutivo também tiveram alguma relevância, com dois prolapsos uterinos e seis distócias (três corresponderam a gestações gemelares com apresentação simultânea, duas deveram-se a posições incorretas e outra ocorreu devido a inércia uterina).

Foi ainda seguido o caso de uma ovelha que apresentou sintomatologia nervosa de uma forma aguda, suspeitando-se de intoxicação por uma planta vulgarmente conhecida por cicuta (*Conium maculatum*), que já tinha ocorrido anteriormente na exploração. Os efeitos da toxicidade verificam-se após ingestão de cerca de 1% do peso corporal (Quintas *et al.*, 2014). A sintomatologia observada foi hipersíalía, tremores musculares, convulsões e cegueira bilateral, os quais são compatíveis com os sinais clínicos descritos na intoxicação por esta planta (Quintas *et al.*, 2014).

As intervenções na espécie caprina resumiram-se a seis casos de diarreia neonatal, um parto distócico (gestação gemelar com apresentação simultânea) e um prolapso vaginal (tabela14).

Tabela 14 - Casos clínicos de caprinos, em número absoluto e FR (%), n=8).

Caso clínico	Nº animais	FR
Diarreia neonatal	6	75,0%
Distócia	1	12,5%
Prolapso vaginal	1	12,5%
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>100,0%</b>

Nos ovinos realizaram-se também quatro necrópsias e procedeu-se a colheita de sangue para pesquisa de *Coxiella burnetti* (agente etiológico da Febre Q) em 11 animais. As causas de morte identificadas na necrópsia foram septicémia, traumatismo, parasitose e intoxicação.

### 2.3.3) Clínica de equídeos

O número de ações de clínica na espécie equina foi de 90 casos, traduzindo não só o significativo valor económico dos animais como o apego sentimental que lhes é atribuído pelos seus proprietários. Como é possível constatar, através da observação do gráfico 11, o sistema locomotor foi o que teve maior representatividade, seguido da pele e anexos e odontologia. As ações relativas aos sistemas respiratório, digestivo e musculoesquelético e a área da oftalmologia apresentaram uma proporção relativa muito inferior às anteriormente referidas. Alguns casos clínicos que não se enquadravam em nenhuma das áreas foram agrupados numa categoria designada outros casos.

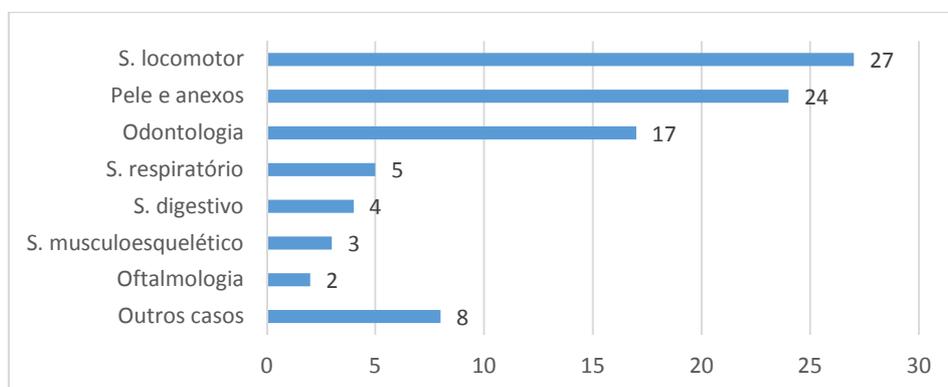


Gráfico 11 - Distribuição da casuística de clínica, em equídeos, pelo sistema envolvido, em número absoluto (n=90).

### 2.3.3.1) Sistema locomotor

O sistema locomotor foi aquele em que acompanhámos um maior número de intervenções, entre exames de claudicação, exames em ato de compra e exames radiológicos aos membros (tabela 15).

Tabela 15 - Casos clínicos envolvendo o sistema locomotor de equinos, em número absoluto e FR (% , n=27).

Intervenções	Nº animais	FR
Exame de claudicação	12	44,5%
Exame em ato de compra	10	37,0%
Exame radiológico	5	18,5%
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100,0%</b>

Com podemos verificar pela análise da tabela 15, o exame de claudicação foi o procedimento mais frequente, sendo o propósito deste exame aferir a localização da afeção dentro do sistema locomotor. O exame iniciava-se com a anamnese conjuntamente com o proprietário, onde se recolhiam informações como a idade, a aptidão do cavalo, o motivo da consulta, a data, modo e circunstâncias do aparecimento da claudicação, o tratamento anteriormente aplicado e qual a resposta do animal. Posteriormente realizava-se o exame visual (avaliação da atitude, postura, assimetrias, aprumos e deformações) e o exame físico completo, que incluía a palpação e avaliação da sensibilidade das várias estruturas anatómicas, realizando-se neste momento o exame com a pinça de cascos (figura 10).



Figura 10 - Teste de sensibilidade nos cascos de um equino, com recurso à pinça de cascos.

Após a conclusão desta fase iniciava-se o denominado exame dinâmico, onde se fazia a avaliação da simetria dos movimentos nos vários andamentos. As provas realizadas foram “oitos” a passo, trote em linha reta, volteio a trote (à guia para as duas mãos e com transição entre piso mole e duro), volteio a galope e testes dinâmicos de flexão articular. Nos últimos era realizada a flexão das articulações das extremidades durante um minuto, ao fim do qual o animal saía a trotar e se avaliava a evolução da claudicação. Quando a origem da afeção não era demasiado óbvia realizavam-se ainda bloqueios anestésicos perinervosos e/ou exames imagiológicos (figura 11).



Figura 11 - Radiografia da extremidade distal do membro posterior esquerdo de um equino.

O exame realizado em ato de compra pressupõe a determinação do estado de saúde do animal, à data do exame, e a identificação de fatores de risco que possam ter implicação na atividade previsível que o equino venha a desenvolver no futuro. Tal como no exame de claudicação, o realizado no momento da compra cobre a identificação do animal, o exame estático, o exame dinâmico e os meios de diagnóstico auxiliares, sendo a radiografia a prova imagiológica mais utilizada. O exame *standard* inclui projeções dos cascos, boletos, carpos e tarsos (Crespo, 2014).

No final do exame deve ser produzido um relatório, cuja conclusão não se traduz num diagnóstico ou decisão de compra, mas tão somente na referência rigorosa ao estado clínico do animal no momento, constituindo mais um elemento que o potencial comprador deverá ponderar antes da sua decisão final (Crespo, 2014).

### 2.3.3.2) Pele e anexos

Como é possível constatar pela tabela 16, as afeções relacionadas com a pele e anexos mais recorrentes foram a renovação de pensos compressivos e o tratamento de feridas traumáticas. Os nove procedimentos de tratamento de feridas incluíram seis equinos e três asininos.

Tabela 16 - Casos clínicos da área pele e anexos em equídeos, em número absoluto e FR (%), n=24.

Caso clínico	Nº animais	FR
Mudança de pensos	11	45,8%
Ferida	9	37,5%
Abcesso de casco	2	8,3%
Fissura da ranilha	1	4,2%
Nodulectomia	1	4,2%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100,0%</b>

A urgência no tratamento de uma ferida depende essencialmente da extensão da lesão e da sua localização. A localização próxima de estruturas sinoviais alerta para a possibilidade de desenvolvimento de artrite ou tenosinovite séptica, as quais podem levar a uma claudicação severa e persistente e ao eventual aparecimento de laminite no membro contralateral (Fino, 2011).

A abordagem nestes casos consistiu na tosquia e limpeza da zona da ferida, para melhor avaliar as estruturas envolvidas. Nenhum dos casos acompanhados desenvolveu artrite séptica, levando a uma melhoria do prognóstico. A realização de uma sutura de aproximação dos bordos nem sempre pode ser realizada, já que se a ferida tiver mais de 24 horas existe um elevado risco de infeção. Sempre que necessário aplicou-se um penso compressivo. O tratamento envolvia ainda a administração de anti-inflamatórios, como a fenilbutazona (Butasyl<sup>®</sup>) ou soxibuzona (Danilon<sup>®</sup>), e antibióticos, como a gentamicina (Gentayet<sup>®</sup>), enrofloxacina (Baytril<sup>®</sup>) ou uma associação de penicilina e estreptomicina (Pendistrep<sup>®</sup>).

As principais vantagens dos pensos compressivos são impossibilitar a contaminação da ferida, imobilizar a zona lesionada, facilitar a cicatrização e reduzir a formação de edema (Fino, 2011). Antes da colocação do penso procedia-se à lavagem da ferida com uma solução antiséptica. Posteriormente aplicava-se um penso não aderente, que era fixo com uma ligadura de algodão. Depois, envolvia-se com um rolo de algodão e, por fim, colocava-se uma ligadura elástica (Coflex<sup>®</sup>). Numa fase inicial os pensos eram trocados de dois em dois dias.

### 2.3.3.3) Odontologia

Os casos clínicos relacionados com a odontologia que tivemos oportunidade de acompanhar constaram de 14 correções da mesa dentária e três extrações de dentes de lobo, correspondentes ao primeiro pré-molar superior (tabela 17).

Tabela 17 - Casos clínicos de odontologia de equinos, em número absoluto e FR (%; n=17).

Intervenção	Nº animais	FR
Correção da mesa dentária	14	82,3%
Extração de dentes de lobo	3	17,7%
Total	17	100,0%

As afeções dentárias em equinos são frequentes devido a alguns atributos específicos desta espécie, como o facto de o crescimento e o desgaste dentários ocorrerem de forma contínua. Nos últimos séculos tem-se observado uma transformação da dieta e no comportamento alimentar dos cavalos, especialmente devido à intervenção humana. Como herbívoros que são, os equinos possuem dentes adaptados para pastar durante a maior parte do dia. Porém, nos nossos tempos, os animais passam gradualmente menos tempo a mastigar, pelo maior recurso ao alimento concentrado na sua dieta, em detrimento do alimento forrageiro. Tal alteração propicia a ocorrência de zonas de sobrecrescimento, que tendem a agravar-se ao longo do tempo (Jones & Smith, 2008).

Os casos de correção da mesa dentário foram realizados em animais que apresentavam quebras de rendimento desportivo, perda de peso, disfagia ou anorexia. Em todos emergiam pontas dentárias cortantes nos dentes pré-molares e/ou molares. Antes do início dos procedimentos corretivos efetuava-se uma sedação ligeira, com a combinação de detomidina (Domosedan<sup>®</sup>), na dose de 0,05 mg/kg, e butorfanol (Dolorex<sup>®</sup>), na dose de 0,1 mg/kg. A correção era realizada com recurso a um abre-bocas e a limas dentárias, manuais e elétricas.

#### 2.3.3.4) Sistema respiratório

Ao longo do estágio foram acompanhados cinco casos envolvendo o sistema respiratório (tabela 18), quatro deles foram de pneumonia e um de doença respiratória obstrutiva crónica (DROC).

Tabela 18 - Casos clínicos envolvendo o sistema respiratório de equinos, em número absoluto e FR (%; n=5).

Caso clínico	Nº animais	FR
Pneumonia	4	80,0%
DROC	1	20,0%
Total	5	100,0%

Em cavalos adultos, a pneumonia tem uma etiologia frequentemente bacteriana, embora também possa ocorrer pneumonia fúngica. O aparecimento da pneumonia bacteriana costuma ser secundário a eventos que levem à supressão do sistema imunitário, como sejam infeções virais, transportes de longa duração, anestesia geral ou atividade física intensa (Rush & Mair, 2004a). Entre os vários agentes etiológicos atribui-se maior importância a *Streptococcus zooepidemicus*, *Actinobacillus suis* e *Streptococcus equi var equuli*. Os principais sinais clínicos são a tosse, a dispneia, o corrimento nasal mucopurulento, a febre, a depressão e a auscultação de sons de crepitação na cavidade torácica (Rush & Mair, 2004a).

O tratamento implementado dos casos seguidos comportou a realização de antibioterapia com ceftiofur (Eficur<sup>®</sup>), na dose de 2,2 mg/kg, uma associação de sulfadiazina e trimetropim (Trivetrim<sup>®</sup>), na dose de 20 mg/kg, ou penicilina e estreptomicina (Pendistrep<sup>®</sup>). Recorreu-se ainda a terapia anti-inflamatória, com o flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>), na dose de 1,1 mg/kg.

A DROC, vulgarmente conhecida por pulmoeira, é uma doença alérgica que afeta sobretudo cavalos de idade avançada e que estejam estabulados em boxes pouco ventiladas e com grande exposição ao pó (Rush & Mair, 2004b). O animal assistido apresentava tosse crónica, dispneia, respiração abdominal e auscultação de sibilos na cavidade torácica. A terapia comportou a administração de um broncodilatador, o clenbuterol (Spasmobronchal<sup>®</sup>), e um corticoesteróide, a dexametasona (Vetacort<sup>®</sup>), na dose de 2,5 mg/kg. Para lá destes fármacos,

recomendou-se, por um lado, uma melhor ventilação da boxe e, por outro, não realizar as operações de limpeza da mesma na presença do animal.

#### 2.3.3.5) Sistema digestivo

Ao longo do estágio foram acompanhados quatro equinos com patologia a nível do sistema digestivo, três deles com sintomatologia de cólica e um animal apresentava obstrução esofágica (tabela 19).

Tabela 19 - Casos clínicos envolvendo o sistema digestivo de equinos, em número absoluto e FR (%; n=4).

Caso clínico	Nº animais	FR
Cólica	3	75,0%
Obstrução esofágica	1	25,0%
Total	4	100,0%

A designação popular de cólica corresponde ao conceito utilizado para designar uma dor abdominal aguda. A cólica em equinos é uma doença com elevada incidência, podendo ter etiologias bastante distintas. Numa primeira abordagem a um animal com cólica interessa determinar se esta é de natureza médica ou cirúrgica, sabendo-se desde logo que mais de 90% dos casos são pouco complicados e reagem rapidamente à terapia anti-inflamatória. Para que o prognóstico seja favorável deve-se atuar tão cedo quanto possível, devendo-se realizar a anamnese e o exame físico de forma rápida e sistemática (Jones & Smith, 2008).

Existem várias particularidades nesta espécie que a predispõem à ocorrência de cólica, tais como: o longo tamanho do palato mole e a elevada tensão a nível do cárdia, os quais impedem o vômito; o pequeno volume do estômago em relação à capacidade digestiva total; o facto do intestino delgado ter um comprimento elevado e estar preso a um mesentério muito longo e livre, predispondo ao desenvolvimento de volvos e encarceramentos; a presença de flexuras no trajeto do cólon maior, as quais poderão constituir obstáculos à passagem do alimento; a ausência de fixações transversais no cólon maior, aumentando a suscetibilidade a deslocamentos.

Muitas vezes é difícil alcançar um diagnóstico definitivo. Nos casos acompanhados, os animais apresentavam sinais de dor, tendo o exame físico revelado taquicardia moderada, desidratação e hipomotilidade ou mesmo atonia intestinal. Para além destes sinais comuns aos quatro casos, um animal apresentava uma linha tóxica na mucosa oral, sugestiva de endotoxémia, e outro revelou uma impactação do cólon menor na palpação transretal. A terapêutica implementada baseou-se na reidratação do animal, quer por via IV quer pela sonda nasogástrica, e pela administração de laxantes ou lubrificantes, como a parafina, sorbitol (Sorbilax<sup>®</sup>) ou sulfato de magnésio. Recorreu-se também a terapia anti-inflamatória, com recurso ao flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>), na dose endotóxica de 0,25 mg/kg, ou à dipirona

(Vetalgin<sup>®</sup>), na dose de 10 mg/kg. Recomendou-se ainda manter jejum durante 24 horas e a realização de passeios com o animal, para estimular o peristaltismo.

#### *2.3.3.6) Sistema musculoesquelético*

Os casos clínicos enquadrados com afeição do sistema musculoesquelético limitaram-se a três situações de rbdomiólise, sendo que esta é uma síndrome complexa muitas vezes associada a miopatias relacionadas com a atividade física. Provavelmente esta é a patologia muscular mais frequente em equinos de desporto, sobretudo em raças que se especializaram em provas de endurance. Existem duas situações que frequentemente motivam a ocorrência de rbdomiólise, sendo uma o aparecimento da doença em cavalos de endurance sujeitos a um treino inadequado para a competição e a outra tem a ver com a ocorrência de miopatias em cavalos que habituados a uma rotina diária de treino e que ficaram estabulados durante alguns dias, continuando com o mesmo consumo de hidratos de carbono (Valberg, 2008).

Os cavalos afetados com esta doença apresentam taquipneia, sudorese elevada e relutância em deslocar-se devido à rigidez muscular e à dor associada, causada pela acumulação de ácido láctico. Nos casos mais severos pode ocorrer mioglobínúria, recumbência ou apresentar sinais de cólica. Estes sinais podem aparecer durante ou após a realização de exercício físico (Valberg, 2008).

Dois dos casos assistidos ocorreram com animais que tinham feito um raide recentemente. O outro caso apareceu num cavalo árabe que também participava em provas de endurance, mas a emergência dos sinais clínicos não esteve diretamente ligada à competição. De facto, o animal treinava regularmente, mas teve algumas semanas parado devido a uma claudicação, tendo apresentado rbdomiólise quando voltou a treinar.

O tratamento implementado pretende cumprir quatro objetivos principais como sejam limitar as lesões musculares, controlar a dor, repor os níveis de fluidos e electrólitos e reduzir os danos a nível renal (Valberg, 2008). Os equinos intervencionados apresentavam-se desidratados e com mioglobínúria. Nestas situações a mioglobina é nefrotóxica (Valberg, 2008). Assim, interessa aumentar a diurese, pelo que foram administradas doses elevadas de fluidos (NaCl 0,9%) IV, só se interrompendo a fluidoterapia após a urina regressar à sua coloração normal. O uso de um diurético, como a furosemida (Lasix<sup>®</sup>), na dose de 1 mg/kg, também foi implementado. Os anti-inflamatórios utilizados foram a fenilbutazona (Phenylarthritis<sup>®</sup>), na dose de 4,4 mg/kg, e o dimetilsulfóxido (DMSO). Para facilitar a vasodilatação periférica utilizou-se a acepromazina (Calmivet<sup>®</sup>). Procedeu-se ainda a suplementação com vitamina E e selénio. Por fim, quando o animal demonstrava que conseguia movimentar-se sem apresentar dor evidente, forçava-se este a caminhar a passo, pois o exercício ligeiro auxilia a excreção do ácido láctico.

### 2.3.3.7) Oftalmologia

Os casos clínicos relacionados com a oftalmologia limitaram-se a dois equinos com uveíte recorrente. Esta afeção manifesta-se por um padrão de inflamação intraocular, em que os vários episódios de uveíte aguda são separados por períodos de quiescência. Entre os principais agentes etiológicos destacam-se a *Leptospira*, a *Brucella* e o *Onchocerca cervicalis*. Os sinais frequentemente observados são opacidade da córnea, fotofobia e blefaroespasma (Maggs, 2008). Nos dois casos tratados realizou-se a medição da pressão intraocular com o tonómetro, revelando um valor superior ao normal. Antes do início da terapia descartou-se a presença de úlcera, através da aplicação de fluoresceína. A terapêutica realizou-se com a aplicação tópica de atropina (Atropocil<sup>®</sup>), que tem ação midriática, e de uma pomada contendo prednisolona e cloranfenicol (Prednifalmina<sup>®</sup>). Os proprietários foram alertados para o facto de a terapia poder ser prolongada, não sendo contudo de descurar a ocorrência de recidivas.

### 2.3.3.8) Outros casos

Para além do vasto conjunto de situações já referidas foram também intervencionados três animais com piroplasmose e, ainda, mais um que desenvolveu uma reação anafilática. Foram também efetuadas orquiectomias em quatro cavalos (tabela 20).

Tabela 20 - Número absoluto e FR (%; n=8) de outros casos clínicos acompanhados em equinos.

Caso clínico	Nº animais	FR
Orquiectomia	4	50,0%
Piroplasmose	3	37,5%
Reação anafilática	1	12,5%
Total	8	100,0%

A piroplasmose equina consiste numa afeção causada por dois hemoparasitas, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, apresentando o segundo uma seroprevalência bastante superior. Estes parasitas têm como vetores ixodídeos pertencentes aos géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyaloma* (Zobba *et al.*, 2008).

A piroplasmose assume natureza endémica em vários países do sul da Europa, como é o caso de Portugal. A doença tem grande impacto económico sobre o rendimento das coudelarias, não só devido à morbilidade, à mortalidade e aos custos de tratamento, mas também pelo facto de a presença de hemoparasitas constituir um obstáculo à exportação de equinos para vários países em que a doença não seja endémica (Zobba *et al.*, 2008). Em animais infetados com *B. caballi* é comum ocorrer eliminação espontânea do parasita. Por outro lado, nos equinos infetados com *T. equi* não há indícios robustos da ocorrência do desaparecimento espontâneo do parasita. Após superação da infeção pelo hospedeiro, este desenvolve imunidade que o protege contra infeções futuras, convertendo-se num portador latente durante o resto da vida (Zobba *et al.*, 2008).

Nos três casos acompanhados, os sinais clínicos observados foram anemia, icterícia, hipertermia, anorexia, depressão, taquicardia e taquipneia. O diagnóstico através da observação dos parasitas no esfregaço sanguíneo nem sempre é possível, pelo que se costuma recorrer à serologia para deteção de anticorpos ou antigénios. O tratamento implementado constou de fluidoterapia, imidocarb (Imizol<sup>®</sup>), flunixin meglumine (Niglumine<sup>®</sup>) e uma suplementação em ferro (Suplefer<sup>®</sup>).

#### 2.3.3.9) Outros procedimentos

Foram ainda realizados 53 exames complementares nos equídeos, em que se destacaram os 39 exames coprológicos realizados. Os restantes exames foram o micro-hematócrito, a serologia, o hemograma e as análises bioquímicas (gráfico 12).

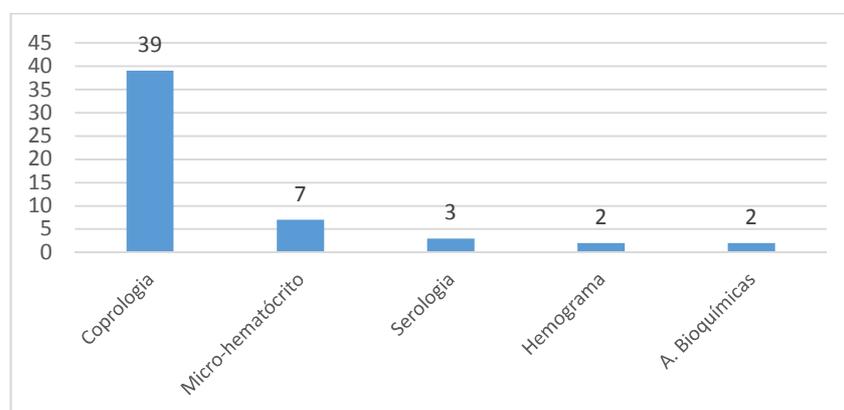


Gráfico 12 - Exames complementares em equinos, em número absoluto (n=53).

#### 2.4) Exame inicial em montarias

Outra área de intervenção que desenvolvemos durante o estágio correspondeu à inspeção sanitária de carcaças de espécies de caça maior, nomeadamente javalis e veados. De acordo com o “Edital nº1 - Tuberculose em Caça Maior” da DGAV, as montarias realizadas na área epidemiológica de risco necessitam de ser acompanhadas por um médico veterinário, que tem como principal função realizar o exame inicial das carcaças dos animais abatidos e pesquisar a presença de lesões características de tuberculose. Atualmente são oito os concelhos do distrito de Portalegre que estão inseridos na zona de risco, sendo eles Arronches, Campo Maior, Castelo de Vide, Crato, Elvas, Marvão, Nisa e Portalegre.

Ao longo do estágio foram cobertas nove montarias, tendo-se realizado o exame inicial em 85 javalis e 93 veados (figura 12). O número de carcaças rejeitadas de javalis e veados foi, respetivamente, 12 e 5 (tabela 21).

Tabela 21 - Exames iniciais e rejeições por espécie caçada, em número absoluto e FR (%; n=178).

Espécie	Nº exames iniciais	Nº rejeições	Taxa de rejeição
Javali	85	12	14,1%
Veado	93	5	5,4%
Total	178	17	9,6%

Registe-se que nem todas as montarias acompanhadas ocorreram na referida área de risco. Em quatro montarias as carcaças dos animais destinavam-se à comercialização e de acordo com o Regulamento 853/2004, todos os produtos da caça destinados a entrar na rota comercial têm de ser sujeitos a exame inicial. É importante referir que a maioria dos animais reprovados por terem lesões suspeitas de tuberculose bovina (LSTB) (figura 13) foi caçada em concelhos fora da zona epidemiológica de risco definida no Edital nº1, pelo que seria desejável que houvesse uma atualização dessa mesma área.



Figura 12 - Exame inicial em carcaças de javali.



Figura 13 - LSTB num Ln. submandibular de javali

### 3) Revisão bibliográfica da tuberculose bovina

#### 3.1) Introdução

A TB é uma doença infecciosa que afeta um grande leque de hospedeiros, onde o Homem se encontra incluído. A importância socioeconómica atribuída a esta afeição torna-a uma doença de declaração obrigatória (DGAV, 2014). Ainda não foi possível a sua erradicação, apesar dos esforços nacionais e europeus terem sido iniciados há mais de duas décadas. Os elevados custos que um programa de erradicação acarreta obrigam todos os intervenientes a trabalharem de forma coordenada para que o objetivo prioritário seja atingido assim que possível (DGAV, 2013a).

A fase de pré-erradicação da TB que se vinha a atingir progressivamente em Portugal sofreu um súbito agravamento nos índices de prevalência e incidência da doença a partir de 2008 (European Commission, 2010). Um dos principais motivos atribuído a este facto foi a possibilidade de infeção por contacto com espécies silváticas que funcionam como reservatório da doença, em particular o javali (*Sus scrofa*) e o veado (*Cervus elaphus*) (European Commission, 2010). A confirmação desta hipótese obrigou as autoridades competentes a implementar legislação específica para os atos venatórios, com objetivos sanitários e de monitorização (DGAV, 2011). Por enquanto a aplicação desta legislação limita-se à zona de risco epidemiológico, que está confinada a alguns concelhos do Alentejo e da Beira Interior, junto à fronteira com Espanha. Estas são zonas em que os valores de prevalência da doença em explorações de bovinos são substancialmente superiores à média nacional (DGAV, 2013a).

Nesta revisão bibliográfica não se pretendeu fazer uma descrição exaustiva da doença, mas sim focar abreviadamente os seus aspetos principais, comuns às várias espécies hospedeiras, e realçar algumas particularidades específicas dos bovinos, javalis e veados.

#### 3.2) Etiologia

A TB é uma doença crónica causada por *Mycobacterium bovis* embora, mais recentemente, tenha sido também associado o *Mycobacterium caprae* (Aranaz *et al.*, 1999). Ambos os agentes pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), que engloba ainda as seguintes estirpes: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* bacilo *Calette-Guérin* (BCG), *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipedii* (Skoric *et al.*, 2007). Tais espécies são bastante semelhantes entre si, sendo que *M. bovis* e *M. tuberculosis* partilham mais de 99% da identidade genética, o que comprova a homologia dentro do grupo (Waters *et al.*, 2011). De referir que, entre as diferentes micobactérias, *M. bovis* é aquela que pode afetar uma maior diversidade de hospedeiros (Aranaz *et al.*, 2004).

A designação *Mycobacterium*, derivada de *Mycos* que em grego significa “fungo”, deve-se ao facto de a bactéria apresentar um crescimento idêntico ao dos fungos, uma vez que forma uma

película à superfície dos meios de cultura líquidos semelhante a um micélio. Todavia, a observação microscópica veio comprovar que se tratavam efetivamente de bactérias (Skoric *et al.*, 2007). Estes organismos caracterizam-se por serem imóveis, aeróbios estritos, não esporulados, possuem forma de bastonete e apresentam pouca capacidade de coloração com *Gram*, não obstante serem considerados *Gram* positivo. O principal atributo que distingue as micobactérias da maioria das restantes bactérias é a capacidade de reterem o corante na coloração de *Ziehl-Neelsen*. Tal especificidade deve-se ao facto de a parede bacteriana reter o corante, não permitindo a sua remoção por soluções alcoólicas ou ácidas, daí a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (Skoric *et al.*, 2007).

### 3.3) Epidemiologia

A transmissão da TB é afetada por vários fatores, entre os quais se destacam a interação entre os animais infetados e as populações suscetíveis, as vias de infeção, a dose mínima infetante, as vias de excreção, a quantidade de agentes eliminados, a viabilidade dos bacilos excretados na natureza, a localização anatómica das lesões e a estrutura das mesmas (Corner, 2006).

O gado bovino é bastante suscetível à infeção respiratória, em que a dose mínima infecciosa pode ser de apenas cinco bacilos, desde que veiculados na forma de aerossóis (Corner, 2006). Deste modo, a infeção por esta via pode originar lesões pulmonares e ao nível dos linfonodos (Inn) brônquicos e mediastínicos (Wilkins & Woolums, 2008). No entanto, o período de risco da infeção por aerossóis é muito reduzido, devido à curta viabilidade dos mesmos no exterior (Corner, 2006), pelo que as elevadas densidades populacionais favorecem a transmissão por esta via (Skuce *et al.*, 2012). Por outro lado, a via de infeção digestiva tem pouca expressão nos bovinos, já que a dose mínima infecciosa tem um valor bastante elevado, na ordem dos  $10^7$  bacilos, muito superior ao número de bacilos com que os bovinos contactam normalmente na natureza (Corner, 2006). Assim, acredita-se que os casos de infeção por via digestiva, com lesões nos Inn. mesentéricos, se devam à reinfeção por deglutição de saliva contaminada (Wilkins & Woolums, 2008). Um dos motivos apontados para esta resistência à infeção por via oral é o efeito bactericida que as secreções gástricas produzem nas micobactérias, tal como está descrito para *M. tuberculosis* (Gaudier & Gernez-Rieux, 1962, citado por Corner, 2006).

A excreção de *M. bovis* pelos bovinos infetados ocorre essencialmente através do ar expirado, das secreções respiratórias e das fezes, sendo também possível que ocorra transmissão através de leite, da urina, do corrimento vaginal ou por via de lesões abertas de Inn. periféricos (Radostitis, 2007d). A sobrevivência das micobactérias no ambiente depende de fatores vários, como a temperatura, a humidade e o efeito bactericida da dissecação causado pela radiação solar e ultravioleta (Corner, 2006; Radostitis, 2007d;). As micobactérias podem permanecer viáveis por períodos de oito semanas nas fezes, 18 dias em águas estagnadas (Wilkins & Woolums, 2008) ou durante várias semanas em carcaças contaminadas (Aranaz *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2009).

Em virtude dos bovinos serem os hospedeiros naturais de *M. bovis*, é lógico concluir que inicialmente a infeção se tenha transmitido destes para as espécies silváticas. No entanto, as apertadas medidas de controlo a que os bovinos são sujeitos sugerem que atualmente os hospedeiros silváticos desempenhem um importante papel na transmissão da doença aos bovinos (Mendoza *et al.*, 2006).

Os javalis podem ser infetados por via respiratória ou digestiva, admitindo-se que a última possa ser mais importante devido aos hábitos necrófagos de ingestão de vísceras e carcaças contaminadas, o que potencia o contacto com uma elevada quantidade de agentes infetantes (Aranaz *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2008). Nesta espécie, os juvenis e as fêmeas aleitantes associam-se em grupos matriarcais, onde o contacto íntimo entre os indivíduos facilita a propagação da doença (Naranjo *et al.*, 2008).

A distribuição lesional no veado também sugere que possa ocorrer infeção por via respiratória ou digestiva (Cunha *et al.*, 2012). Admitia-se que a via respiratória constituísse a forma mais importante, no entanto a presença de lesões na cavidade abdominal, relatada em estudos mais recentes, tem posto em causa essa teoria (Zanella *et al.*, 2008; Martín-Hernando *et al.*, 2010).

### 3.4) Patogénese

Após serem detetadas pelo sistema imunitário, as micobactérias são fagocitadas pelos macrófagos, os quais podem ser recrutados aos monócitos sanguíneos ou aos histiócitos. Contudo, essas bactérias conseguem sobreviver graças aos mecanismos de inibição da fusão do lisossoma com o fagossoma. A multiplicação das micobactérias produz a morte do fagossoma, com o conseqüente recrutamento de mais macrófagos. A repetição deste processo conduz à formação de um granuloma designado por tubérculo. Esta primeira fase da infeção leva à formação do complexo primário, que provoca uma lesão característica desencadeada no local de penetração e no linfonodo associado (Skoric *et al.*, 2007). Quando a infeção ocorre pela via respiratória, as lesões costumam surgir a nível pulmonar e nos linfonodos da cavidade torácica. Nos casos em que a infeção se deve à via digestiva é comum serem encontradas lesões a nível dos lnn. mesentéricos. As lesões nos linfonodos da cabeça podem ocorrer após infeção por qualquer das vias (Lisle *et al.*, 2002).

Nos bovinos predomina a resposta imunitária do tipo celular, em que as células T libertam citocinas reguladoras da atividade dos macrófagos. Esses macrófagos poderão transformar-se em células irregulares com um grande núcleo vesicular (as denominadas células epitelióides) ou em células gigantes de *Langhans*, ambas presentes no granuloma tuberculoso (Skoric *et al.*, 2007).

Por outro lado, a resposta do tipo humoral dos bovinos não desempenha um papel tão importante como a do tipo celular, uma vez que a produção de anticorpos é tardia e não confere um grande efeito protetor (Radostitis, 2007d). Contudo, parece que o mesmo não se aplica a algumas espécies silvestres (Boadella *et al.*, 2011).

O complexo primário pode progredir para uma fase de generalização pelo resto do organismo, algo mais frequente nas espécies mais sensíveis à doença (Skoric *et al.*, 2007). A presença de fibrose a envolver as lesões dependerá da resistência de cada espécie à doença, sendo que nas mais resistentes tende a existir fibrose mais evidente, seguida de necrose central e de calcificação (Radostitis, 2007d). Como as micobactérias pertencentes ao MTC não produzem toxinas e normalmente estão envolvidas pelo tubérculo, é recorrente que a infeção permaneça assintomática durante largos períodos (Skoric *et al.*, 2007).

### 3.5) Diagnóstico *ante-mortem*

A deteção *ante-mortem* de *M. bovis* torna-se difícil nas espécies silváticas, devido à frequente ocorrência de infeção subclínica e aos erros associados aos testes de diagnóstico disponíveis (Lisle *et al.*, 2002). A prova da IDC tem uma baixa especificidade e obriga a manipular os animais duas vezes, o que se torna impraticável. O teste do gama interferão poderia apresentar resultados satisfatórios, mas também se torna pouco viável pois necessita de amostras de sangue recentes, material de laboratório sofisticado e tem de ser realizado por pessoas qualificadas (Garcia-Bocanegra *et al.*, 2012).

No caso dos javalis, contrariamente ao que se regista em outros mamíferos, os anticorpos contra *M. bovis* podem ser detetados com segurança através da serologia (Boadella *et al.*, 2011). A utilização de um teste rápido com um sistema inovador de *dual-path platform* demonstrou uma boa concordância com o isolamento bacteriano e apresentou significativos valores de sensibilidade e especificidade, permitindo ainda resultados num período inferior a 20 minutos. Não foram observadas diferenças de sensibilidade relacionadas com a idade, pelo que é admissível que esta técnica se adequa ao diagnóstico de infeções recentes ou de estados crónicos da doença nesta espécie (Boadella *et al.*, 2011). Gowtage-Sequeira *et al.* (2009) e Buddle *et al.* (2010) avaliaram a eficiência de dois testes rápidos de fluxo lateral aplicados em cervídeos e obtiveram elevados valores de sensibilidade, não obstante o valor da especificidade poder ser afetado pela presença de infeção por paratuberculose. Ainda assim os autores consideraram ambos os testes adequados para o rastreio da TB em veados.

Deste modo, a deteção de anticorpos específicos poderá consituir uma alternativa viável já que a serologia é rápida, tem um custo reduzido e a sua aplicação não se reveste de grande complexidade, permitindo a utilização em larga escala (Boadella *et al.*, 2011). O uso de testes de ELISA em larga escala, como testes de rastreio da TB em espécies silváticas, pode ter bastante utilidade para a determinação de prevalências, no conhecimento dos mecanismos de transmissão e na implementação de medidas de controlo da tuberculose (Garcia-Bocanegra *et al.*, 2012).

### 3.6) Diagnóstico *post-mortem*

Os testes para diagnóstico *post-mortem* da TB incluem a pesquisa macroscópica de lesões suspeitas de tuberculose, a observação de esfregaços corados pelo método *Ziehl-Neelsen* para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, a histopatologia, a *polymerase chain reaction* (PCR) e a cultura bacteriana (Santos *et al.*, 2010). Após a realização do isolamento bacteriano, podem ser aplicadas ainda técnicas de genotipagem molecular, como a spoligotipagem - *spacer oligonucleotide typing* - ou o *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats* (MIRU-VNTR).

Na observação macroscópica, a TB pode ser indiciada pela presença de lesões granulomatosas em várias localizações anatómicas. Estes granulomas apresentam uma grande diversidade de características, podendo ser caseosos, purulentos ou apresentar focos necróticos ou de calcificação, variando bastante entre as espécies (Wilkins & Woolums, 2008). Assim, torna-se algo complexo distinguir estas lesões de outras com diferente etiologia, como sejam as causadas por helmintes, por outras bactérias (*Rhodococcus*, *Actinomyces*, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium* e *Nocardia*) ou por fungos (*Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Blastomyces* e *Histoplasma*). Algumas neoplasias, como o adenocarcinoma ou a leucose bovina, também podem ter o mesmo aspeto macroscópico (Lisle *et al.*, 2002).

Entre as várias espécies pertencentes ao género *Mycobacterium*, nem todas causam LSTB. Por exemplo no caso do javali, a infeção causada por um agente pertencente ao *Mycobacterium avium complex* (MAC) apenas provoca lesões histológicas mínimas (Boadella *et al.*, 2011). Parra *et al.* (2006) isolaram *Mycobacterium avium avium* em 4% das LSTB de javalis em Espanha. Contudo, Garrido *et al.* (2010), em estudo mais recente, recorreram a uma infeção experimental em javalis jovens com este agente e não observaram sinais clínicos em vida. Na necrópsia só foram observadas pequenas lesões em javalis submetidos a doses infantantes muito elevadas, muito superiores às encontradas na natureza. Assim, *M. avium avium* evidenciou uma patogenicidade muito baixa para este hospedeiro em particular. Por seu lado, Muñoz-Mendonza *et al.* (2013) sustentam que, no javali, as infeções causadas por um agente pertencente ao MAC só podem ser distinguidas das infeções por *M. bovis* se forem usadas como técnicas de diagnóstico a cultura bacteriana ou o PCR, já que as lesões são bastante similares nos domínios anatómico e histológico.

Os esfregaços corados permitem realizar um diagnóstico presuntivo através da deteção de bacilos corados, tendo como vantagens o reduzido custo e o facto de não ser necessário material sofisticado (Lisle *et al.*, 2002). Esta técnica revela-se adequada quando os tecidos têm muitas micobactérias, o que não parece ser o caso de muitas das amostras de javalis. Para além disso, esta metodologia pode não permitir a distinção entre as várias estirpes de micobactérias (Santos *et al.*, 2010).

O uso da histopatologia é limitado pela possível incapacidade de distinguir as lesões causadas por *M. bovis* das provocadas por outras micobacterioses (Lisle *et al.*, 2002). Martín-Hernando *et al.*, (2007), realizaram um estudo a partir de cadáveres de javali em que se isolou *M. bovis* e

constatarem que 82,68% desses cadáveres tinham LSTB, correspondendo esse valor à sensibilidade da técnica. Nos cadáveres sem alterações à observação macroscópica só foi possível identificar alterações microscópicas, através da histopatologia, em metade dos casos, ou seja, em 8,66% do total das amostras. Na restante metade não foi observada qualquer alteração (macroscópica ou microscópica). Tais dados comprovam que, quer a observação macroscópica quer a histopatologia têm uma sensibilidade inferior a 100% no diagnóstico de TB. No caso dos veados, a sensibilidade da observação macroscópica foi ainda mais reduzida, situando-se nos 71,43% (Martín-Hernando *et al.*, 2010).

Os procedimentos baseados na amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA), como o PCR, são relativamente rápidos e têm elevados valores de sensibilidade e especificidade (Lisle *et al.*, 2002).

Apesar de ser dispendiosa e necessitar de maior disponibilidade de tempo, a bacteriologia é considerada a metodologia *gold standard* para o diagnóstico da TB (Santos *et al.*, 2009; Muñoz-Mendonza 2013). Todavia, é frequente considerar que a sensibilidade deste teste é de 100%, valor esse que é sobrestimado devido à ocorrência de falsos negativos. Em amostras provenientes de animais abatidos a tiro é usual que os tecidos estejam danificados e contaminados, obrigando a uma descontaminação prévia à efetivação da cultura, o que pode motivar uma perda de sensibilidade (Martín-Hernando *et al.*, 2010). Tal situação é particularmente grave quando a eficiência de outras técnicas de diagnóstico está a ser avaliada tendo como referência exclusiva os resultados da cultura bacteriana (Santos *et al.*, 2010).

O desempenho dos vários testes de diagnósticos isoladamente fica muito aquém dos resultados quando são utilizadas duas técnicas em paralelo. Na realidade, a combinação de dois métodos permite aumentar significativamente os valores da sensibilidade e do valor preditivo negativo (VPN), ainda que possa ocorrer um ligeiro decréscimo na especificidade (Santos *et al.*, 2010)

No caso concreto do javali, Santos *et al.* (2010) calcularam o valor real da sensibilidade da cultura bacteriana no diagnóstico de TB, obtendo um valor de 81%, o qual é muito inferior ao admitido na maioria dos estudos. Assim, para esta espécie considera-se mais adequado realizar o diagnóstico através da testagem em paralelo com a histopatologia e a cultura, conferindo valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 96,7%, respetivamente (Santos *et al.*, 2010). Para o caso dos veados, Rohonczy *et al.* (1996) consideraram a bacteriologia como o teste de referência e calcularam os valores de sensibilidade e especificidade para a observação macroscópica e histopatológica. A especificidade foi idêntica para as duas técnicas (89%) e a sensibilidade foi superior para a observação macroscópica, com 93% para esta e cerca de 88% para a histopatologia. Para uma sensibilidade máxima devem realizar-se estas duas técnicas em paralelo. Martín-Hernando *et al.* (2010) constataram que para os veados, as proporções de falsos negativos e falsos positivos são idênticas, com valores a rondar os 30%. Esta particularidade indicia que os programas de vigilância baseados apenas na deteção de LSTB à necrópsia fornecem valores de prevalência que não devem diferir muito da realidade.

A spoligotipagem é considerada a melhor técnica de tipificação molecular de *M. bovis* para ser utilizada numa primeira abordagem, já que se baseia no PCR, é facilmente reproduzível e exige menor disponibilidade de mão-de-obra do que as restantes metodologias (Duarte *et al.*, 2008). O fundamento da técnica é bastante simples, baseando-se na determinação do polimorfismo da região de repetição direta pela deteção da presença ou ausência de sequências espaçadoras específicas (Kamerbeek *et al.*, 1997). Assim, os resultados da spoligotipagem podem ser rapidamente comparados entre os diversos laboratórios, já que se encontram disponíveis online robustas bases de dados internacionais (Duarte *et al.*, 2008).

Uma técnica alternativa é o MIRU-VNTR, cuja utilidade como técnica de genotipagem para agentes do MTC está confirmada em vários países, por apresentar um poder discriminatório superior às restantes técnicas. Porém, em Portugal não está estabelecido um painel de *loci* estandardizado e a diversidade de *locus* para cada cenário epidemiológico obriga a que sejam utilizados diferentes painéis (Duarte *et al.*, 2010). A aplicação do MIRU-VNTR é particularmente vantajosa em explorações de bovinos que apresentem múltiplos genótipos de *M. bovis*. Esta situação é frequente nos grandes efetivos de bovinos com manejo extensivo, que por norma têm elevadas taxas de reposição e são realizadas bastantes movimentações de animais. Adicionalmente, as práticas de manejo extensivo e as grandes áreas de pastagem permitem a sobreposição de habitats de espécies silvestres, o que gera uma maior diversidade das fontes de infeção (Duarte *et al.*, 2010).

### 3.7) Programa de erradicação em Portugal

O programa português de erradicação da TB, cofinanciado pela União Europeia desde 1987, iniciou-se na década de 50 do século XX (DGAV, 2013a). O facto de Portugal não ser um país com grande tradição na exportação de bovinos não gerou muita pressão nos produtores para obter o estatuto de oficialmente indemne, tornando-se ainda mais problemático por um significativo número de produtores considerarem a TB como uma doença do passado (European Commission, 2010). Têm existido algumas dificuldades nos últimos estadios de erradicação, pelo facto de se atingir o limite da sensibilidade dos testes de diagnóstico (Duarte *et al.*, 2010) e porque em áreas certas onde predomina o manejo extensivo em bovinos, ocorrer partilha da pastagem com espécies silváticas reservatórias da doença (Garcia-Bocanegra *et al.*, 2012).

Em Portugal verificava-se que os níveis de TB nas explorações de bovinos estavam a diminuir lentamente, mas de forma sustentada, desde 2000 até 2008, ano em que foram alcançados os valores mínimos. No final deste período registaram-se valores de 0,11% e 0,08% para a prevalência e incidência de exploração, respetivamente, enquanto a prevalência individual foi de 0,03% (DGAV, 2013a). Porém, de forma inesperada, em 2009 e 2010 observou-se um aumento significativo dos valores dos principais indicadores epidemiológicos (gráfico 13). Este aumento foi originado grandemente pela contribuição de explorações localizadas na região

Centro e Alentejo (DGAV, 2013a), onde se encontram as maiores unidades do país, sendo o sistema extensivo o predominante.

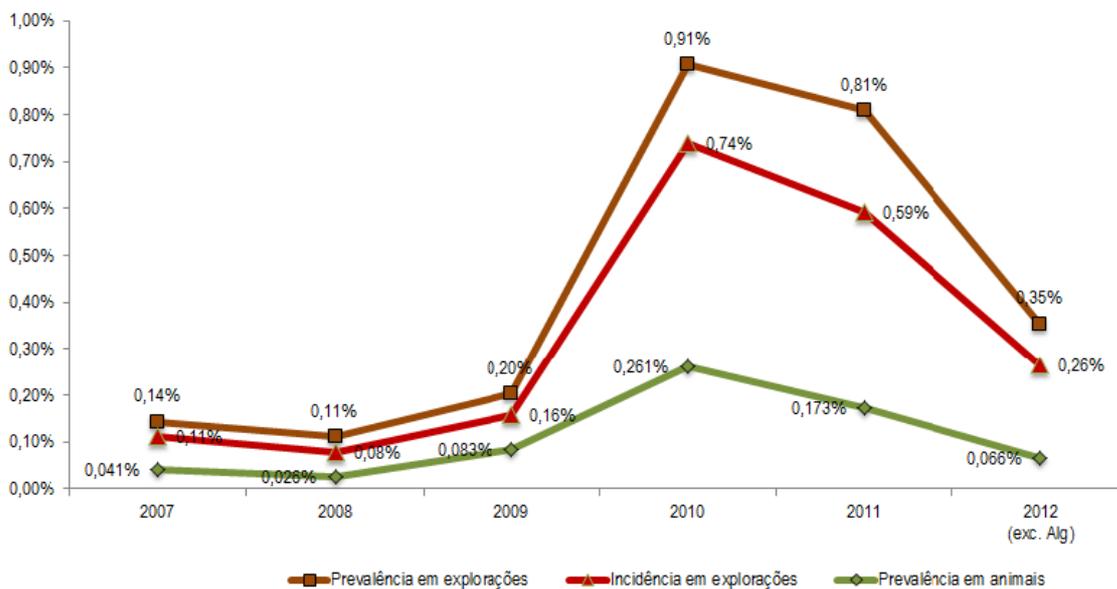


Gráfico 13 - Evolução dos indicadores epidemiológicos sobre a TB em Portugal, entre 2007 e 2012 (adaptado de DGAV, 2013a).

Este incremento súbito dos índices da TB terá tido na sua origem uma combinação entre o aumento dos casos reais de doença e o aumento da eficiência da vigilância em matadouro. O esforço das autoridades competentes no treino especializado propiciou, aparentemente, o aumento da sensibilidade da inspeção médico-veterinária. Este período coincidiu ainda com a fase em que foi alterado o excipiente da tuberculina usado no rastreio da TB, pelo que tais alterações da composição e potência do reagente terão contribuído para o aumento do número de casos positivos (Cunha *et al.*, 2011).

No ano de 2010, altura em que se atingiram valores máximos nos indicadores da doença (0,91% e 0,74% para a prevalência e incidência de exploração, respetivamente, e 0,26% para a prevalência individual), foram realizados 61 inquéritos epidemiológicos em explorações T2.1 (European Commission, 2010), estando as fontes de infeção e as respetivas proporções expostas no gráfico 14.

Da observação do gráfico 14 torna-se evidente que a causa identificada mais frequente foi o contacto direto com espécies silváticas, em 30% dos casos. É relevante notar que em 39% das ocorrências não foi possível determinar a causa dos surtos de TB, supondo-se que uma parte destes também possa estar relacionada com a transmissão a partir da fauna selvagem (European Commission, 2010).

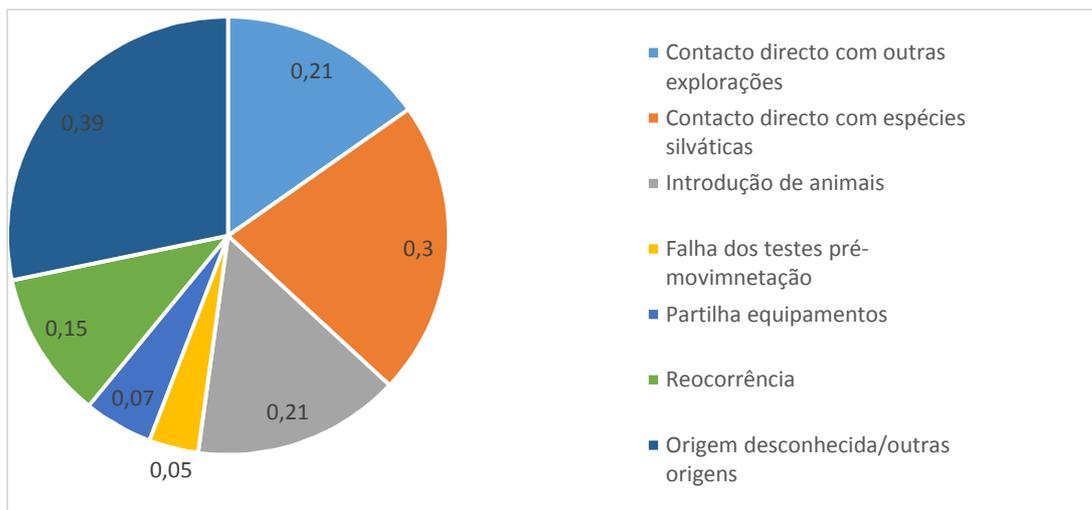


Gráfico 14 - Resultados dos inquéritos epidemiológicos realizados em 2010  
(adaptado de European Commission, 2010).

Na tentativa de fazer face ao agravamento verificado, promoveram-se várias iniciativas. Houve uma melhoria das performances de diagnóstico *ante-mortem* (através do acompanhamento e controlo da execução da prova de IDC e da formação e reciclagem dos executores), incrementou-se a população de animais testados nas zonas de risco, apertou-se o controlo no cumprimento dos prazos definidos para a reinspeção dos efetivos infetados, uniformizaram-se as normas de aplicação dos TPM e, por fim, iniciou-se a monitorização das espécies de caça de maior. A implementação destas medidas surtiu o efeito desejado, pelo que em 2012 ocorreu um decréscimo acentuado dos indicadores epidemiológicos (DGAV, 2013a). Tais resultados incentivam e suportam a continuidade das medidas implementadas. É importante notar que os valores desse ano já não englobam o Algarve, dado que a região foi reconhecida como oficialmente indemne para a TB.

Nas situações em que a erradicação da TB está a ser mais difícil de alcançar já foi considerada a hipótese de se implementarem programas de vacinação, não obstante o facto da vacinação dos bovinos contra a TB ser proibida pela legislação da União Europeia. A alteração da legislação só poderá ocorrer na sequência de estudos robustos sobre determinados aspetos como a segurança da vacina, a eficiência dos testes diagnósticos DIVA ou os benefícios dos programas de vacinação (Authie *et al.*, 2013). Para implementar estes estudos podem ser tiradas várias lições dos programas de vacinação já iniciados noutras espécies silváticas (Górtazar *et al.*, 2007).

### 3.7.1) Implementação do Edital nº1 da DGAV

A tomada de consciência de que a presença do agente causal da TB em animais da caça maior no território nacional configurava um fator de risco que coloca entraves à erradicação e controlo da doença na população de bovinos levou a DGAV a implementar medidas de combate. Destas, realçamos a publicação do “Edital nº1 - Tuberculose em Caça Maior”, no dia 29 de abril de 2011, que veio estabelecer regras numa área em que a legislação era

praticamente inexistente. O edital definia uma área epidemiológica de risco e descrevia as obrigações das várias entidades intervenientes nas montarias destinadas à caça de espécies de caça maior. A zona de risco ficou circunscrita à área de 19 concelhos localizados junto à fronteira com Espanha, pertencentes às regiões Centro e Alentejo, tal como se pode observar na figura 14. Contudo, esta zona pode ser modificada, caso o risco epidemiológico o justifique. A definição da zona de risco foi feita de acordo com os dados obtidos da inspeção das carcaças dos animais caçados, já que estes conferem uma imagem do estatuto sanitário da população (Mendoza *et al.*, 2006).

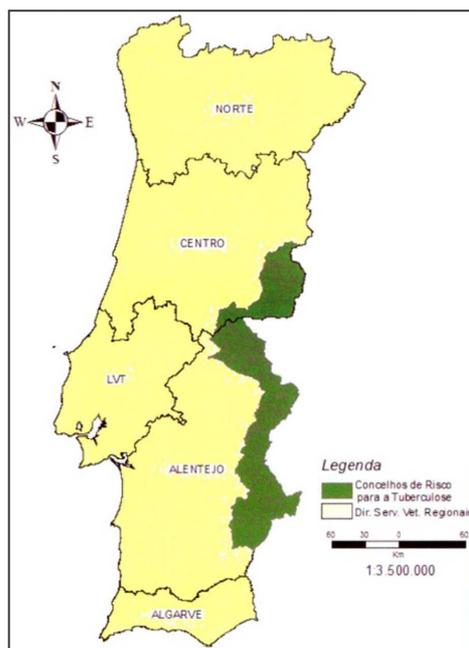


Figura 14 - Zona de Risco definida pelo Edital nº1 (adaptado de DGAV, 2011).

As entidades gestoras de caça têm que garantir a presença de um médico veterinário, que conste da lista de técnicos autorizados pela DGAV, que efetuará o acompanhamento das montarias realizadas na zona epidemiológica de risco e respetivo exame inicial das carcaças. Adicionalmente, têm que disponibilizar um local de trabalho que disponha de condições mínimas que garantam as condições higiosanitárias adequadas para a execução daquela tarefa, entre as quais se destaca a utilização de água corrente, a existência de iluminação apropriada, a restrição do acesso a outros animais e a garantia de destino final adequado às carcaças e órgãos rejeitados ou provenientes da evisceração (DGAV, 2011).

O médico veterinário designado tem que supervisionar o processo de evisceração das carcaças e executar o seu exame inicial, sendo obrigado a recolher e enviar para laboratório amostras das LSTB detetadas. Para além disto, tem ainda a obrigação de comunicar, de forma rápida, à Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional (DSAVR) a deteção dessas mesmas lesões. É ainda sua incumbência a supervisão da correta eliminação das vísceras e carcaças rejeitadas (DGAV, 2011).

Existem, contudo, diferenças nas rotinas utilizadas na inspeção *post-mortem* pelos vários médicos veterinários, o que leva a discrepâncias significativas nos valores obtidos para a prevalência e incidência dos distintos estudos efetuados (Cunha *et al.*, 2011).

### 3.8) Epidemiologia dos reservatórios silváticos da doença

A detecção de *M. bovis* em espécies de vida silvática não implica diretamente que a infeção esteja estabelecida nessas espécies em particular nem que estas constituam um reservatório natural da doença (Corner, 2006; Santos *et al.*, 2009). Pode até suceder que populações com elevada prevalência de TB não tenham qualquer importância na epidemiologia da doença (Corner, 2006). De facto, só uma limitada proporção de espécies silváticas infetadas com *M. bovis* pode atuar como hospedeiro de manutenção (Lisle *et al.*, 2002). Num hospedeiro de manutenção, a infeção pode persistir apenas pela transmissão intraespecífica, podendo adicionalmente constituir uma fonte de infeção para outras espécies. Nos hospedeiros acidentais, a infeção não existe indefinidamente, salvo se ocorrer continuamente reinfeção por parte de outras espécies. Por norma os hospedeiros acidentais não constituem focos de transmissão da doença a outras espécies (Corner, 2006; Naranjo *et al.*, 2008). A definição do estatuto de hospedeiro acidental ou de manutenção é essencial para decidir se o controlo destas populações é necessário e para prever a persistência da infeção nessas espécies, caso a fonte de infeção seja removida. Assim, pode-se decidir com maior segurança sobre a melhor forma de atuação (Corner, 2006).

Para determinar o papel de cada espécie no ciclo de transmissão da tuberculose é necessário obter resposta sobre algumas questões-chave relacionadas com a natureza e a dinâmica da infeção, com a distribuição geográfica dos hospedeiros silvestres e com a interação dos hospedeiros silvestres e domésticos (Corner, 2006). Porém, a categorização das espécies como hospedeiros reservatórios ou de manutenção é um tema bastante controverso (Aranaz *et al.*, 2004).

Os reservatórios silváticos da TB existem por todo o mundo e têm vindo a interferir com os esforços de erradicação da doença em bovinos (Muñoz-Mendonza *et al.*, 2013). Uma vez estabelecida a doença na fauna selvagem torna-se bastante difícil conseguir a sua erradicação (Santos *et al.*, 2009). A epidemiologia da TB é bastante complexa, sendo influenciada pelo clima, habitat ou ainda pela ação humana. Deste modo, o estatuto dos hospedeiros pode variar não só entre as várias regiões mas também ao longo do tempo (Górtazar *et al.*, 2012).

Existem vários exemplos de reservatórios selvagens da TB dispersos por todo mundo, entre eles destacam-se o búfalo (*Syncerus caffer*) na África do Sul, o bisonte (*Bison bison*) no Canadá, o cusu-zorro (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia ou o veado-branco (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos da América (EUA) (Naranjo *et al.*, 2008). Na Europa existe a confirmação de três importantes reservatórios selvagens da TB, mormente o texugo (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda, o javali na região mediterrânica da Península Ibérica (PI), e os veados em diversas zonas do continente (Muñoz-Mendonza *et al.*, 2013).

Estes diversificados exemplos comprovam que espécies pertencentes a diferentes grupos taxonómicos são capazes de atuar como reservatórios da TB, dependendo das condições específicas de cada ecossistema (Naranjo *et al.*, 2008).

### 3.8.1) A situação na Península Ibérica

O facto de na PI a TB afetar uma grande diversidade de hospedeiros enquadra-se na definição sistema *multi-host pathogen*, em que a persistência e dispersão do agente patogénico dependem da densidade populacional do hospedeiro de manutenção e também das interações existentes entre as várias espécies (Santos *et al.*, 2012).

Os javalis são os ungulados silvestres existentes em maior quantidade na PI e tanto a sua dispersão como a densidade populacional têm aumentado gradualmente nos últimos anos (Vicente *et al.*, 2006; Martín-Hernando *et al.*, 2007; Naranjo *et al.*, 2008), especialmente no sul da península onde existe forte tradição cinegética desta espécie.

Atualmente o veado também se encontra disperso por todo o território nacional e, apesar de não haver consenso quanto à sua densidade populacional, crê-se que em Portugal as maiores concentrações desta espécie estejam localizadas junto à fronteira, nas regiões de Moura-Barrancos e no Tejo Internacional (Cunha *et al.*, 2012).

O valor económico destas espécies faz com que desempenhem um importante papel na caça a nível ibérico (Vicente *et al.*, 2006). Assim, têm sido tomadas medidas de manejo intensivo na sua gestão, tais como a melhoria das vedações, a alimentação artificial, o abeberamento e as translocações (Naranjo *et al.*, 2008; Garcia-Bocanegra *et al.*, 2012), aspetos que promovem a agregação animal (Garcia-Bocanegra *et al.*, 2012). Além disto, determinados fatores ambientais agravam essa situação, já que a seca nos meses de estio diminui a disponibilidade de água, contribuindo para a concentração dos animais nos mesmos locais (Naranjo *et al.*, 2008). Assim, os animais estarão suficientemente próximos para que a transmissão da TB por via respiratória possa ocorrer (Aranaz *et al.*, 2004).

Um dos principais argumentos que defende que estes ungulados silvestres possam desempenhar um papel de hospedeiros de manutenção no contexto ibérico é o facto de, em determinadas zonas do sul de Espanha, ter havido circulação de *M. bovis* entre essas espécies, em áreas cercadas e que não tiveram qualquer contato com o gado doméstico durante mais de vinte anos (Górtazar *et al.*, 2005; Naranjo *et al.*, 2008). Também os resultados das técnicas de tipificação molecular indiciam forte evidência de partilha de estirpes de *M. bovis* entre bovinos e javalis na região do Alentejo e entre bovinos e veados na Beira Interior (Duarte *et al.*, 2008). Todavia, o cariz crónico da doença torna difícil dizer com total segurança qual o sentido em que a infeção ocorre.

As espécies que parecem desempenhar o papel de verdadeiros reservatórios da TB nas zonas mediterrânicas da PI são o javali e o veado, não havendo consenso quanto à importância

atribuída ao gamo (*Dama dama*) (Santos *et al.*, 2012). Existem ainda outras espécies em que foi isolado o agente da TB, mas que correspondem a hospedeiros acidentais, como é o caso de muflões, corços, sacarrabos, lincos ibéricos, texugos e raposas (Santos *et al.*, 2012). A função que as várias espécies desempenham no ciclo da TB não é uniforme na região peninsular. Por exemplo, na zona atlântica de Espanha (Astúrias e Galiza), o texugo é considerado hospedeiro de manutenção, em especial devido às elevadas densidades populacionais aí observadas (Muñoz-Mendonza *et al.*, 2013). Por seu lado, nessa região o javali parece ter apenas importância como hospedeiro acidental, enquanto no veado não foi realizado qualquer isolamento de *M. bovis* ou *M. caprae* (Muñoz-Mendonza *et al.*, 2013).

Tem-se observado, em habitats mediterrânicos no sul da PI, uma tendência para as explorações de gado se converterem em zonas de caça. Por isso, as interações entre animais domésticos e silváticos têm-se tornado cada vez mais frequentes, aumentando o risco de transmissão da doença, nomeadamente devido à agregação e partilha de recursos (Martínez-López *et al.*, 2013). As densidades populacionais de veados e javalis que se verificam em algumas zonas da PI são muito superiores às densidades normais que a natureza é capaz de suportar, sendo que isto ocorreu não só devido à intervenção humana mas também pela eliminação de predadores naturais, designadamente o lobo ibérico (*Canis lupus*) (Santos *et al.*, 2012).

O mapa representado na figura 15 patenteia a prevalência de TB em javalis nos distritos de Portugal e nas províncias espanholas. Os valores referentes a cada uma das regiões são meramente indicativos, já que nem todos são diretamente comparáveis por haver dados obtidos por cultura e outros por serologia. Como se observa, os valores de prevalência de TB nesta espécie são superiores no sul da PI.

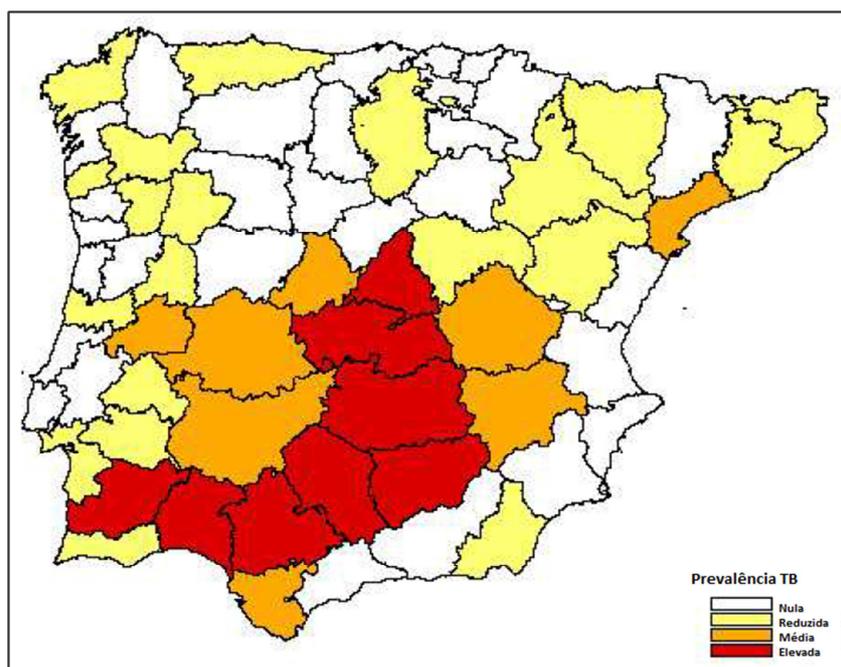


Figura 15 - Mapa da PI com a prevalência de TB em javalis por região administrativa (adaptado de Santos *et al.*, 2012).

Santos *et al.* (2012) compilaram vários estudos epidemiológicos, elaborados na PI, sobre a presença de TB nas espécies silváticas. Utilizando apenas ensaios em que o diagnóstico foi definido tendo por base os resultados da bacteriologia, foi calculada uma metaprevalência de 36% de indivíduos infetados com TB para as populações de javalis e de 21% para veados. Estes valores estão entre os mais elevados a nível mundial (Santos *et al.*, 2012) e têm crescido gradualmente ao longo das últimas décadas (Naranjo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012). A prevalência verificada nos javalis é consistentemente superior à dos veados o que, ainda assim, não significa que estejam mais predispostos a desenvolver a doença clínica (Vicente *et al.*, 2006). O agente causal mais comum é o *M. bovis*, havendo uma pequena proporção de casos devidos a *M. caprae*. Este último é mais frequente no javali, sendo raramente isolado no veado (Santos *et al.*, 2012). Na PI só foi detetado um genótipo de *M. caprae*, o SB0157 (Duarte *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2012).

As técnicas de tipificação molecular permitiram a Cunha *et al.* (2012) constatar que, em Portugal, a maioria dos genótipos de *M. bovis* isolados em javalis e veados também já foram identificados em bovinos, sendo um forte indicativo sobre a ocorrência de transmissão do agente causal da TB entre estas espécies domésticas e silváticas. A figura 16 ilustra a distribuição dos padrões de *M. bovis* e *M. caprae* nas várias espécies da PI. Como é possível observar, apenas dois genótipos de *M. bovis* são exclusivos das espécies silvestres, o SB1091 e o SB1267.

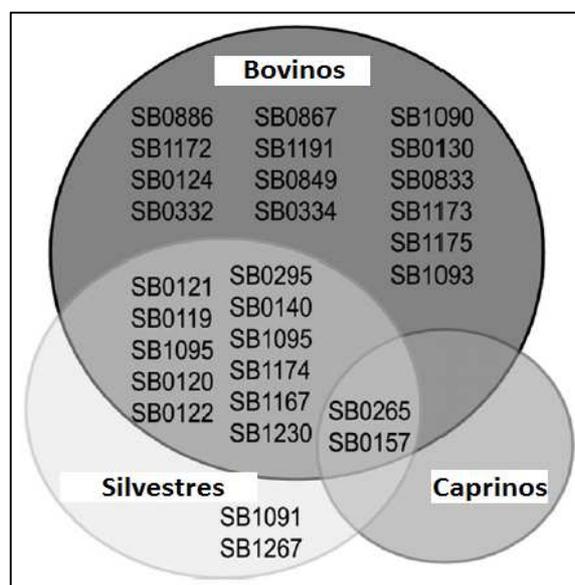


Figura 16 - Distribuição por espécie dos padrões de *M. bovis* presentes na PI (adaptado de Duarte *et al.*, 2008)

Cunha *et al.* (2011) identificaram dois focos regionais no nosso país para a TB em javalis e veados, Idanha-a-Nova e Moura-Barrancos. Apesar de distantes no plano geográfico, estes locais partilham várias características, nomeadamente o facto de possuírem grandes herdades de bovinos de carne com sistemas de produção predominantemente baseados no maneio

extensivo, terem elevados valores de prevalência de TB nas explorações de bovinos e serem duas das principais regiões de caça em Portugal (pela forte tradição cinegética e pelas elevadas densidades populacionais verificadas em javalis e veados).

### 3.9) Caracterização das lesões

Uma característica das infeções por *M. bovis* é a variação na distribuição e no aspeto apresentado pelas lesões para as distintas espécies hospedeiras (Lisle *et al.*, 2002). A informação sobre os atributos e distribuição das lesões é essencial para determinar a importância das espécies enquanto reservatórios para a TB (Martín-Hernando *et al.*, 2007).

#### 3.9.1) Localização anatómica

A distribuição das LSTB depende da via pela qual ocorre a infeção e ainda da ocorrência ou não de disseminação secundária pelo organismo. Os padrões lesionais mais frequentes variam com a espécie, sendo que a maioria das diferenças se deve à resposta imunitária de cada hospedeiro (Lisle *et al.*, 2002; Zanella *et al.*, 2008).

Martín-Hernando *et al.* (2007) verificaram que uma elevada proporção de javalis com TB (cerca de 60%) apresentavam generalização das lesões. Estas conclusões são bastante diferentes das descritas por Vieira-Pinto *et al.* (2011), em que nenhum javali apresentou disseminação das lesões. No caso dos veados, a percentagem de generalização descrita por Martín-Hernando *et al.* (2010) é de 46,4%, enquanto Vieira-Pinto *et al.* (2011) apontam para um valor mais baixo, de 12,5%.

Quanto à localização das LSTB no javali, a maioria das lesões foram observadas nos Inn. da cabeça, em particular nos Inn. submandibulares (Martín-Hernando *et al.*, 2007; Vieira-Pinto *et al.* 2011). Martín-Hernando *et al.* (2007) descrevem que os pulmões eram a segunda região anatómica com mais LSTB, havendo ainda uma pequena percentagem em vísceras abdominais como o fígado e baço. Estes dados são contrariados por Vieira-Pinto *et al.* (2011) já que, para além dos Inn. submandibulares, só identificaram alterações nos Inn. mesentéricos.

Santos *et al.* (2009) referem que as lesões pulmonares detetadas nos javalis estavam quase exclusivamente presentes nos juvenis, sugerindo que grande parte destes morrem antes de atingirem a idade adulta, já que foram poucos os javalis adultos em que se observaram lesões nos pulmões. Os animais juvenis correspondem também à faixa etária com maior proporção de lesões generalizadas, indiciando que são os principais responsáveis pela transmissão da doença (Martín-Hernando *et al.*, 2007). No caso dos veados, as lesões localizam-se essencialmente nos Inn. retrofaríngeos mediais (Martín-Hernando *et al.*, 2010), pulmões (Martín-Hernando *et al.*, 2010; Vieira-Pinto *et al.*, 2011) e Inn. mesentéricos (Zanella *et al.*, 2008; Vieira-Pinto *et al.*, 2011). Para além destes, ainda se encontraram LSTB nas amígdalas e nos Inn. mediastínicos, brônquicos e ileocecais (Martín-Hernando *et al.*, 2010).

### 3.9.2) Histologia

No que respeita aos javalis, observa-se uma diferenciação histológica entre as lesões localizadas e generalizadas. Por um lado, as localizadas são granulomas em que há presença de várias células inflamatórias e, por outro, nas lesões generalizadas observam-se granulomas com centros necróticos e de calcificação (Martín-Hernando *et al.*, 2007). O veado frequentemente apresenta um quadro lesional mais exuberante, desenvolvendo típicas lesões abertas (Vieira-Pinto *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2012). Nestes animais as lesões normalmente são granulomas, na maioria das vezes não encapsulados e contêm numerosos bacilos. O menor grau de encapsulação, em comparação com os javalis, é sugestivo de uma reduzida capacidade do organismo fazer face à infeção (Parra *et al.*, 2006; Zanella *et al.*, 2008). A calcificação das lesões não é muito frequente nesta espécie, tendo Vieira-Pinto *et al.* (2011) relatado que apenas 10% das amostras possuíam calcificação, enquanto para os javalis os valores correspondentes foram de 72%. Quanto às lesões encapsuladas, calcificadas e com reduzida quantidade de micobactérias, muito características dos javalis, parecem possuir pouca capacidade infecciosa (Santos *et al.*, 2009). Em oposição, as lesões dos veados parecem ter maior potencial infeccioso do que as das restantes espécies (Aranaz *et al.*, 2004).

### 3.9.3) Distribuição etária e sexual

Relativamente aos javalis, a maioria dos estudos não refere qualquer sexo como mais predisposto à infeção, não obstante Santos *et al.* (2009) referirem que as fêmeas revelam 4,3 vezes mais hipótese de estarem infetadas do que os machos. Presumivelmente tal discrepância poderá estar relacionada com o comportamento social das fêmeas, que vivem em grupo, enquanto os machos adotam um modo de vida solitário. Os mesmos autores referem ainda que os machos habitam uma área bastante superior à das fêmeas, pelo que podem ter maior poder disseminador da infeção. Nos veados foram os machos que revelaram uma taxa de infeção superior (Santos *et al.*, 2012).

No que respeita à idade, existem informações contraditórias como sustentam Santos *et al.*, 2012. No seu estudo, Vicente *et al.* (2006) reportam taxas de infeção crescentes à medida que a idade do animal progride, o que poderá ser devido à cronicidade da infeção e à probabilidade crescente de infeção durante a vida. Em sentido oposto, a pesquisa de Santos *et al.* (2009) mostra que os animais jovens têm uma taxa de infeção superior, possivelmente devido à elevada mortalidade que afeta esta classe etária. Existe ainda a possibilidade de os javalis juvenis se infetarem na sequência do processo de amamentação, a partir da progenitora (Martín-Hernando *et al.*, 2007), havendo relato de lesões identificadas nas glândulas mamárias (Naranjo *et al.*, 2008). No caso dos veados, as taxas de infeção tornam-se maiores com o avançar da idade (Santos *et al.*, 2012).

### 3.10) Medidas de controlo

Tanto quanto é do nosso conhecimento, são raros os países europeus que dispõem de esquemas de vigilância para a TB nas espécies silváticas, só sendo de notificação obrigatória na Suécia, Finlândia e Noruega. No Reino Unido tal só é obrigatório para os cervídeos (Górtazar *et al.*, 2012). Ora, antes de se iniciar qualquer tentativa de controlo desta doença é necessário que se conheça detalhadamente o papel de cada espécie no ciclo da doença (Santos *et al.*, 2009). Deste modo, como em muitos países não há dados epidemiológicos disponíveis, não se consegue estabelecer um programa de controlo adaptado a essa realidade específica (Santos *et al.*, 2012). O único exemplo de sucesso da erradicação da tuberculose nos bovinos devido à extinção da doença nos hospedeiros silvestres ocorreu na Austrália. O objetivo foi alcançado em virtude do despovoamento do búfalo aquático (*Bubalus bubalis*), o qual era o hospedeiro de manutenção (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012). Todavia, este tipo de medida nem sempre pode ser seguido, dado que muitas das vezes estão envolvidas espécies autóctones, protegidas ou com valor económico e social (Santos *et al.*, 2012).

O controlo da TB baseado nos princípios de testagem e abate compulsivo tem revelado resultados bastante positivos nos bovinos, embora tenha papel pouco relevante nos animais silvestres, sendo pois necessário melhorar os testes de diagnóstico *ante-mortem* previamente à adoção de uma estratégia similar à implementada nos bovinos (Lisle *et al.*, 2002). O diagnóstico da TB em vida é bastante útil para testar os animais antes de serem realizadas translocações (Lisle *et al.*, 2002), já que estas movimentações têm o potencial de introduzir a TB em áreas livres da doença (Santos *et al.*, 2009). Algumas das medidas prioritárias para a erradicação da TB nos bovinos, principalmente nas fases finais do programa, prendem-se com a intensificação das campanhas de testagem e abate em bovinos, associadas à limitação do contacto entre as espécies domésticas e silvestres (Aranaz *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2008).

O controlo da doença nas espécies que apresentam uma elevada densidade populacional pode ser alcançado através de ações de desbaste, situação em que os caçadores desempenham um papel fundamental. No entanto, este tipo de medidas pode causar choque na opinião pública, tendo por isso vários impedimentos legais (Aranaz *et al.*, 2004). Uma das formas mais comuns de evitar o contacto entre espécies domésticas e silvestres é através da melhoria das vedações, não sendo contudo uma medida eficaz nos javalis, que normalmente conseguem transpô-las e, assim, poderão manter o seu potencial disseminador (Aranaz *et al.*, 2004; Mendoza *et al.*, 2006). Outra medida capital para evitar o contacto é separar os locais de alimentação das diferentes espécies (Cunha *et al.*, 2012).

Em Portugal parece-nos desejável que se continue a monitorizar a presença da infeção em javalis e veados, a fim de estabelecer os limites das áreas de risco. Para isso podem ser examinados quer os cadáveres de animais caçados quer os obtidos de outra forma, sendo ambos válidos no fornecimento de informação para os programas de vigilância (Cunha *et al.*, 2012). É importante, também, que os médicos veterinários que realizam inspeção às espécies

caçadas utilizem procedimentos padronizados, tal como já acontece na inspeção de carcaças de bovinos, sendo para isso necessário a realização de mais ações de formação e divulgação nesta área, como sustentam Cunha *et al.* (2012).

A vacinação de hospedeiros silváticos contra a TB já foi proposta como medida de controlo da doença (Aranaz *et al.*, 2004). O sucesso dos programas de vacinação na fauna silvestre requer uma vacina segura, eficaz, barata, com uma única administração e que seja facilmente aplicada na população alvo (Lisle *et al.*, 2002). Existem, contudo, alguns obstáculos que têm que ser superados antes de o processo de vacinação se tornar uma medida equacionável na PI (Aranaz *et al.*, 2004). Registamos como positivo o início de programas de vacinação, utilizando a vacina viva atenuada de *M. bovis* BCG, em texugos, furões e cervídeos (Lisle *et al.*, 2002; Aranaz *et al.*, 2004; Górtazar *et al.*, 2007). Alguns dos programas estão a conferir níveis de proteção satisfatórios. No entanto, antes de se iniciar a vacinação em outros hospedeiros é essencial dispor de estudos inequívocos sobre a segurança e eficácia da vacina. (Górtazar *et al.*, 2007).

A superior probabilidade de sucesso dos programas de erradicação só será alcançada se existir uma correta articulação dos diversos intervenientes no processo, nomeadamente políticos, gestores de caça, autoridades de saúde animal, médicos veterinários, ecologistas, agricultores e os próprios caçadores (Martínez-López *et al.*, 2013). Acresce ainda o facto de, em muitos casos, os animais silváticos possuírem o seu habitat em áreas fronteiriças de Portugal e Espanha o que exige uma maior coordenação das ações sob a responsabilidade dos dois países, inclusive através de ações comuns no plano ibérico (Cunha *et al.*, 2012).

### 3.11) Implicações em Saúde Pública

Em virtude do facto da TB ser uma zoonose, há risco acrescido para os humanos que contactam com animais infetados e para os indivíduos imunocomprometidos (Cunha *et al.*, 2012). Torna-se difícil demonstrar a transmissão da TB das espécies silváticas para o ser humano pois não existe qualquer caso comprovado na PI, embora tal já tenha sido registado nos EUA (Santos *et al.*, 2012). Na maioria dos países desenvolvidos, os casos de tuberculose humana causados por *M. bovis* ou *M. caprae* equivalem a menos de 1% dos casos registados, sendo que a maioria deles correspondem a casos de consumo de produtos derivados de leite não pasteurizado ou, ainda, devido ao contacto prolongado com animais infetados (Rodríguez *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2012). Ainda assim, a associação dos agentes da TB como responsáveis pela tuberculose em humanos é subestimada visto que em muitas ocasiões não chega a realizar-se a tipificação molecular, como referem Górtazar *et al.* (2007).

No caso de Espanha, em relação ao período 2004-2007, foram declarados 110 casos de TB na espécie humana, 89 dos quais devido a *M. bovis* e 11 por *M. caprae*, tendo a maioria destes casos ocorridos no centro e sul do país, em especial em áreas onde a pecuária e a caça desempenham um papel importante nas economias locais (Rodríguez *et al.*, 2009). O

spoligótipo isolado com maior frequência nos seres humanos infetados foi o SB0121 (Rodríguez *et al.*, 2009), que também é o mais comum em bovinos e nas espécies silváticas na PI (Duarte *et al.*, 2008).

## 4) Estudo epidemiológico da TB em espécies de caça maior, na Beira Interior Sul e no Alto Alentejo

### 4.1) Introdução

A TB é uma doença infecciosa causada por *Mycobacterium bovis* ou *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2004). Esta doença afeta um vasto leque de hospedeiros entre animais domésticos e silváticos, podendo ainda infetar o Homem (Lisle *et al.*, 2002). A importância socioeconómica atribuída a esta afeição é elevada, estimando-se que mais de 50 milhões de bovinos em todo o Mundo estejam infetados com *M. bovis*, traduzindo-se em custos anuais que superam os três biliões de dólares (Santos *et al.*, 2009). Para além disto, a TB é também um grave problema de saúde pública, já tendo sido responsável por mortes humanas em todos os continentes habitados (Rodríguez *et al.*, 2009).

Vários países conseguiram atingir a erradicação da TB graças a programas de testagem e abate, reforçados pela vigilância ativa em matadouro (Santos *et al.*, 2009). Em Portugal, o programa de erradicação da TB já se iniciou em 1987 e apesar de todos os esforços que têm sido tomados ainda não foi possível eliminar a doença do país (DGAV, 2013a). Desde o início do século que se verificava uma redução constante dos indicadores epidemiológicos da doença, fazendo prever que a erradicação estaria iminente. Contudo, nos anos de 2008 e 2009 verificou-se um súbito e inesperado agravamento dos índices de prevalência e incidência da TB nas explorações de bovinos (European Commission, 2010). Várias foram as hipóteses apontadas para que esta situação tenha ocorrido, sendo que a principal se referia à possibilidade de serem as espécies silváticas as responsáveis pela transmissão dos agentes da TB para os bovinos, nomeadamente nas regiões do Alentejo e da Beira Interior, onde é frequente a interação entre bovinos e espécies silvestres (European Commission, 2010). A confirmação desta hipótese obrigou as autoridades competentes a implementar legislação específica para as montarias realizadas em certas zonas raianas das regiões Centro e Alentejo, que correspondem a zonas onde a caça e a pecuária desempenham um importante papel na sociedade (DGAV, 2011).

O presente trabalho pretende assim tratar e avaliar os dados relativos aos animais abatidos sujeitos ao exame inicial, nas épocas venatórias de 2011/2012 a 2013/2014 das Divisões de Intervenção Veterinária (DIV) de Castelo Branco e de Portalegre. Desta forma será possível caracterizar a situação epidemiológica da TB em animais silváticos, nomeadamente javalis e veados, na área de estudo. Tentaremos também entender a evolução da doença ao longo do tempo, definir as áreas problemáticas, analisar os resultados das provas laboratoriais e conhecer a localização anatómica mais frequente das LSTB. No final desejamos que as conclusões obtidas forneçam informações proveitosas para a alcançar a desejada erradicação da TB na espécie bovina em Portugal.

## 4.2) Material e métodos

### 4.2.1) Área de Estudo

O estudo decorreu nas áreas sob a responsabilidade das DIV de Castelo Branco e de Portalegre, as quais, de acordo com Decreto-Lei n.º 46/1989, estão localizadas na Beira Interior Sul (BIS) e no AA, respetivamente. Os concelhos considerados em cada zona são os definidos pela área de risco do *Edital nº1 – Tuberculose em caça maior*. Deste modo, os Concelhos de Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Penamacor e Vila Velha de Ródão pertencem à sub-região BIS, enquanto Castelo de Vide, Crato, Marvão, Nisa e Portalegre integram a sub-região do AA. A zona de risco engloba todas as Freguesias destes Concelhos, sendo Castelo Branco e Penamacor as únicas exceções, já que o Edital nº1 só coloca algumas das suas Freguesias na zona de risco.

As duas sub-regiões em estudo são geograficamente adjacentes (figura 17) e estão separadas pelo rio Tejo. As 28 Freguesias do AA e as 24 da BIS têm, respetivamente, uma área aproximada de 1840 e 2573 km<sup>2</sup>.

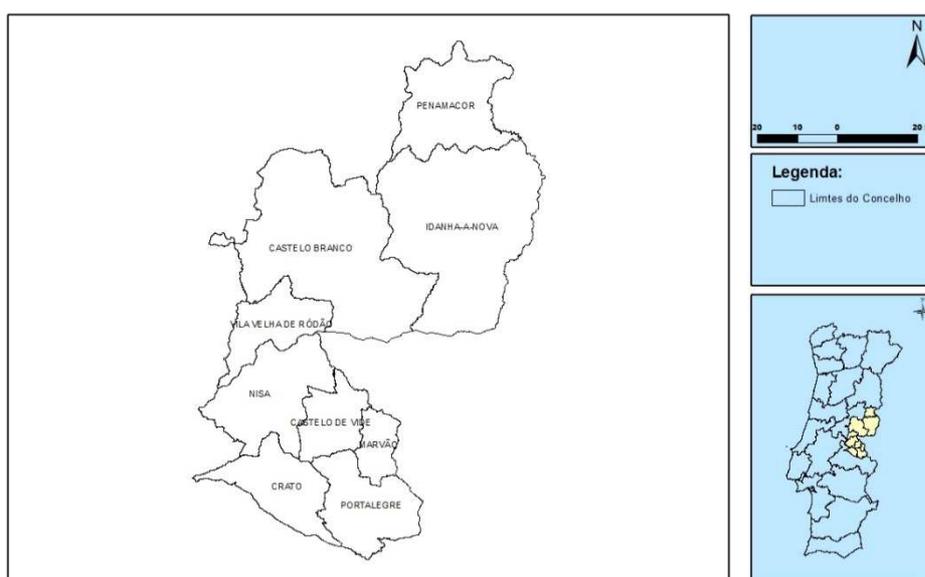


Figura 17 - Localização geográfica da área de estudo.

### 4.2.2) Recolha de dados

A investigação envolveu a recolha de dados relativos às montarias realizadas dentro da área epidemiológica de risco, a qual foi efetuada nas DIV de Castelo Branco e de Portalegre, tendo-se coletado informações sobre o exame inicial das carcaças dos animais abatidos e os resultados das análises laboratoriais das amostras enviadas para o LNIV. Assim, os dados recolhidos foram, para cada zona de caça e época venatória, o número de animais abatidos, a espécie, o sexo, a idade, o número de animais com LSTB, a localização das lesões, o número de amostras enviadas para laboratório, o resultado da histopatologia, o resultado do isolamento bacteriano e, em situações muito limitadas, o resultado da spoligotipagem. O período de estudo

compreende as épocas venatórias de 2011/2012 a 2013/2014, coincidindo portanto com o período pós implementação do *Edital nº1*. Cada época tem início em outubro e termina em março do ano seguinte.

As espécies cinegéticas abatidas nas montarias foram javalis (*Sus scrofa*), veados (*Cervus elaphus*), gamos (*Dama dama*) e muflões (*Ovis ammon musimon*). Porém, só os dois primeiros foram objeto do nosso estudo, visto que na zona visada o risco de infecção por TB foi reduzido para as restantes espécies (nenhum muflão apresentou lesões com confirmação laboratorial e no caso dos gamos isso só ocorreu numa situação).

#### 4.2.3) Exame inicial

O procedimento de rotina consistiu na realização do exame inicial das carcaças de todos os animais abatidos. O exame *in loco* tem por base a incisão dos linfonodos e a observação das vísceras torácicas e abdominais para pesquisa de LSTB. Nas situações em que foi detetado qualquer tipo de lesão compatível com TB, procedeu-se à rejeição das carcaças. Adicionalmente foram recolhidas amostras dessas lesões e enviavam-se para o LNIV. A confirmação laboratorial foi efetuada através de histopatologia e do isolamento bacteriano. O critério para a determinação da positividade definido pelos serviços oficiais foi a testagem em paralelo através destes dois testes laboratoriais. Assim, foram considerados como positivos os casos em que um animal apresentou LSTB no exame inicial e posteriormente, na análise laboratorial, foi isolado *M. Bovis* e/ou em que havia lesões histopatológicas características de TB.

#### 4.2.4) Análise dos dados

A análise estatística dos dados coletados foi executada com recurso aos programas Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010, Microsoft Access<sup>®</sup> 2010 e R<sup>®</sup> 3.0.2. Os mapas que envolvem os *geographical information system* (GIS) foram criados no programa ArcMap<sup>™</sup> 10.1, recorrendo-se às coordenadas de *global positioning system* (GPS) de cada zona de caça. Por outro lado, a definição das variáveis de risco foi feita através do teste de *Fisher* e do cálculo do *Odds-ratio* (OR), tendo sido considerados três níveis de significância (*p-value*): <0,05; < 0,01 e < 0,001. A concordância entre os testes laboratoriais foi calculada através do teste *kappa* (<http://vassarstats.net/kappa.html>).

### 4.3) Resultados

#### 4.3.1) Caracterização dos animais abatidos

Ao longo dos três anos considerados foram abatidos nas duas sub-regiões 9210 animais, dos quais 5180 veados e 4030 javalis. Em ambas as espécies, o número mais elevado de abates ocorreu no último ano (tabelas 22 e 23).

Tabela 22 - Abates de javalis por região e época venatória, em número absoluto (n= 4030).

Região	2011-2012	2012-2013	2013-2014	Total
AA	555	599	659	1813
BIS	834	615	768	2217
<b>Total</b>	<b>1389</b>	<b>1214</b>	<b>1427</b>	<b>4030</b>

Tabela 23 - Abates de veados por região e época venatória, em número absoluto (n= 5180).

Região	2011-2012	2012-2013	2013-2014	Total
AA	247	425	765	1437
BIS	1497	1129	1117	3743
<b>Total</b>	<b>1744</b>	<b>1554</b>	<b>1882</b>	<b>5180</b>

Não obstante o facto de o volume de abates das duas espécies na sub-região beirã ser sistematicamente superior aos valores verificados na zona alentejana, podemos constatar nos gráficos 15 e 16 que as linhas de tendência referentes à BIS apresentam um declive negativo, contrariamente ao verificado no AA.

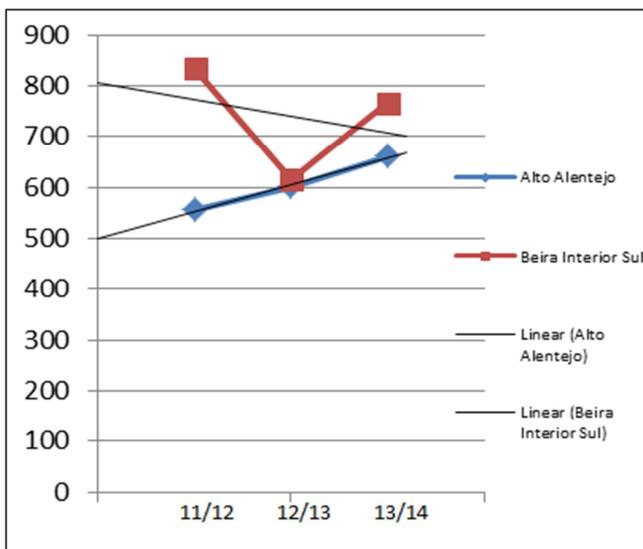


Gráfico 15 - Tendência evolutiva do nº de javalis abatidos, por região.

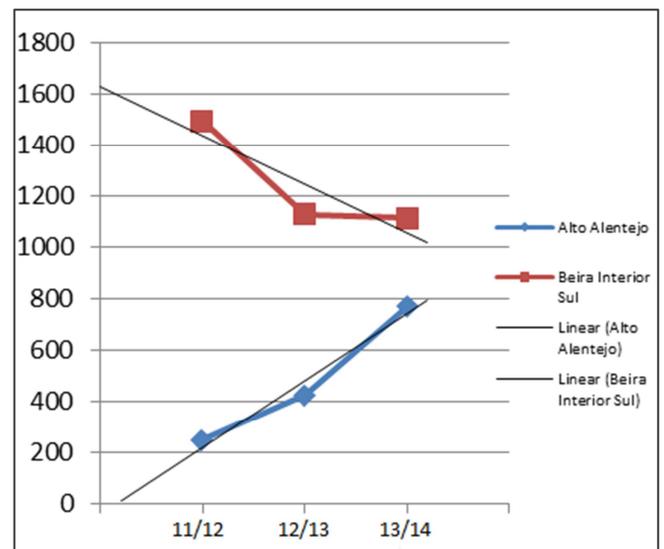


Gráfico 16 - Tendência evolutiva do nº de veados abatidos, por região.

As tabelas 24 e 25 representam a quantidade de animais caçados em cada Concelho e Freguesia da BIS e do AA, respetivamente. Apenas estão representadas as Freguesias onde foram efetivamente caçados javalis e/ou veados em montarias.

Tabela 24 - Abates por Concelho e Freguesia da BIS, em número absoluto e FR (%; n=5960).

Concelho	Freguesia	Javalis			Veados			Total	FR
		11/12	12/13	13/14	11/12	12/13	13/14		
Castelo Branco	Malpica do Tejo	109	19	87	226	110	144	695	12,2%
	Monforte da Beira	48	19	35	140	146	152	540	9,5%
Idanha-a-Nova	Aldeia de Stª Margarida	0	0	6	0	0	0	6	0,1%
	Idanha-a-Nova e Alcafozes	88	68	148	10	0	5	319	5,6%
	Ladoeiro	6	16	0	0	0	0	22	0,4%
	Monfortinho e Salvaterra do Extremo	125	82	57	34	33	19	350	6,2%
	Monsanto e Idanha-a-Velha	19	0	24	5	0	3	51	0,9%
	Oledo	30	32	46	0	0	0	108	1,9%
	Penha Garcia	89	28	116	161	109	93	596	10,5%
	Rosmaninhal	111	64	81	789	564	512	2121	37,3%
	S. Miguel de Acha	19	0	17	0	0	0	36	0,6%
	Toulões	4	28	14	1	1	1	49	0,9%
	Zebreira e Segura	40	114	72	56	99	97	478	8,4%
Penamacor	Aguas	0	1	0	0	0	0	1	0,0%
	Aranhas	5	0	0	0	3	0	8	0,1%
	Penamacor	14	0	7	5	0	8	34	0,6%
Vila Velha de Ródão	Fratel	28	32	13	7	21	25	126	2,2%
	Perais	38	57	12	30	28	25	190	3,3%
	Vila Velha de Ródão	61	55	33	33	15	33	230	4,0%

Na sub-região BIS, a maioria dos animais são abatidos em zonas de caça dos municípios de Idanha-a-Nova (72,8%) e Castelo Branco (21,7%). Em termos de Freguesias, o Rosmaninhal destaca-se claramente das restantes, seguindo-se Malpica do Tejo, Penha Garcia, Monforte da Beira e a união das Freguesias de Zebreira e Segura.

Tabela 25 - Abates por Concelho e Freguesia do AA, em número absoluto e FR (%; n=3250).

Concelho	Freguesia	Javalis			Veados			Total	FR
		11/12	12/13	13/14	11/12	12/13	13/14		
Portalegre	Alagoa	49	0	0	2	0	0	51	1,6%
	Alegrete	31	33	1	0	0	0	65	2,0%
	Ribeira de Nisa	36	23	51	0	0	0	110	3,4%
	Fortios	8	12	33	0	0	0	53	1,6%
	Urra	9	33	27	0	0	0	69	2,1%
	S. Julião	16	0	0	0	0	0	16	0,5%
Castelo de Vide	Póvoa e Meadas	6	29	43	41	204	270	593	18,2%
	Santiago Maior	19	15	24	4	18	21	101	3,1%
	S. João Batista	19	0	0	0	0	0	19	0,6%
	Stª Maria da Devesa	5	0	0	0	0	0	5	0,2%
Crato	Crato e Mártires	136	186	139	3	21	8	493	15,2%
	Monte Pedra	10	18	19	0	0	0	47	1,4%
	Gáfete	8	30	19	0	0	0	57	1,8%
Marvão	Beirã	23	23	62	8	16	18	150	4,6%
	Stº António das Areias	35	0	50	1	0	0	86	2,6%
	Marvão	22	0	14	0	0	0	36	1,1%
	Aramenha	32	44	5	0	47	0	128	3,9%
Nisa	Arez	16	65	48	0	0	0	129	4,0%
	Espírito Santo	26	18	41	13	11	42	151	4,6%
	Montalvão	31	14	33	169	67	320	634	19,5%
	S. Matias	10	11	17	2	17	14	71	2,2%
	Santana	2	20	20	4	24	72	142	4,4%
	Tolosa	6	25	13	0	0	0	44	1,4%

No AA, os municípios com maior quantidade de abates foram Nisa (36,1%), Castelo de Vide (22,1%) e Crato (18,4%). Em cada Concelho as Freguesias onde se caçaram mais animais foram, respetivamente, Montalvão, Póvoa e Meadas e Crato e Mártires.

As figuras 18 e 19 resumem o panorama global do número de abates na área de estudo, para javalis e veados respetivamente.

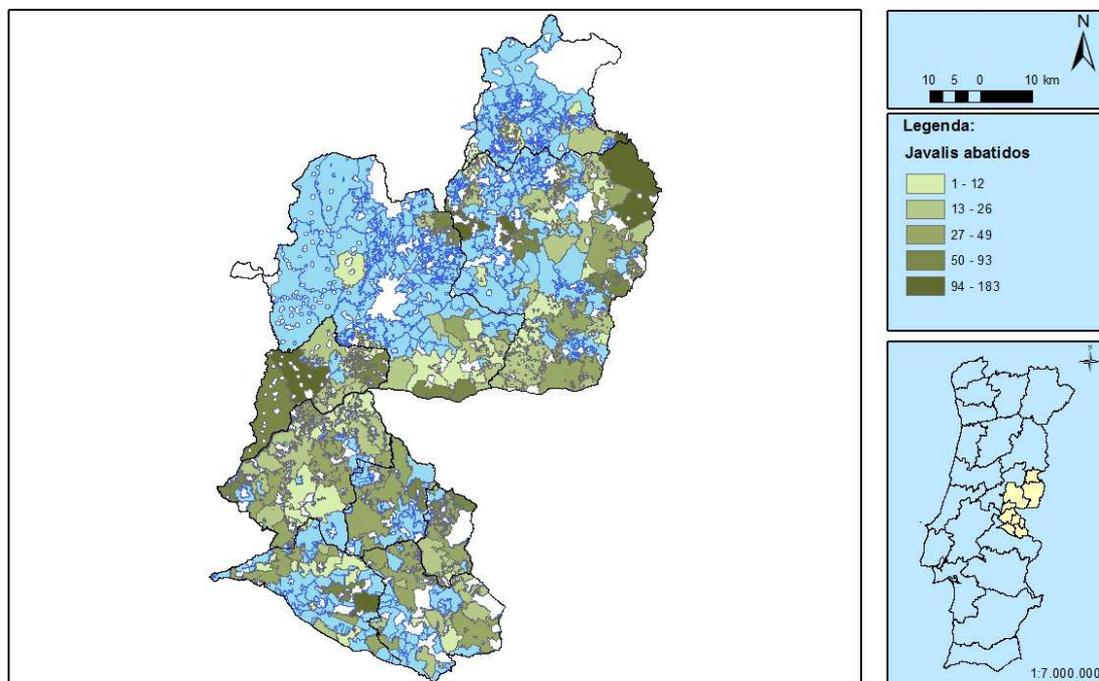


Figura 18 - Distribuição geográfica dos javalis abatidos na área de estudo.

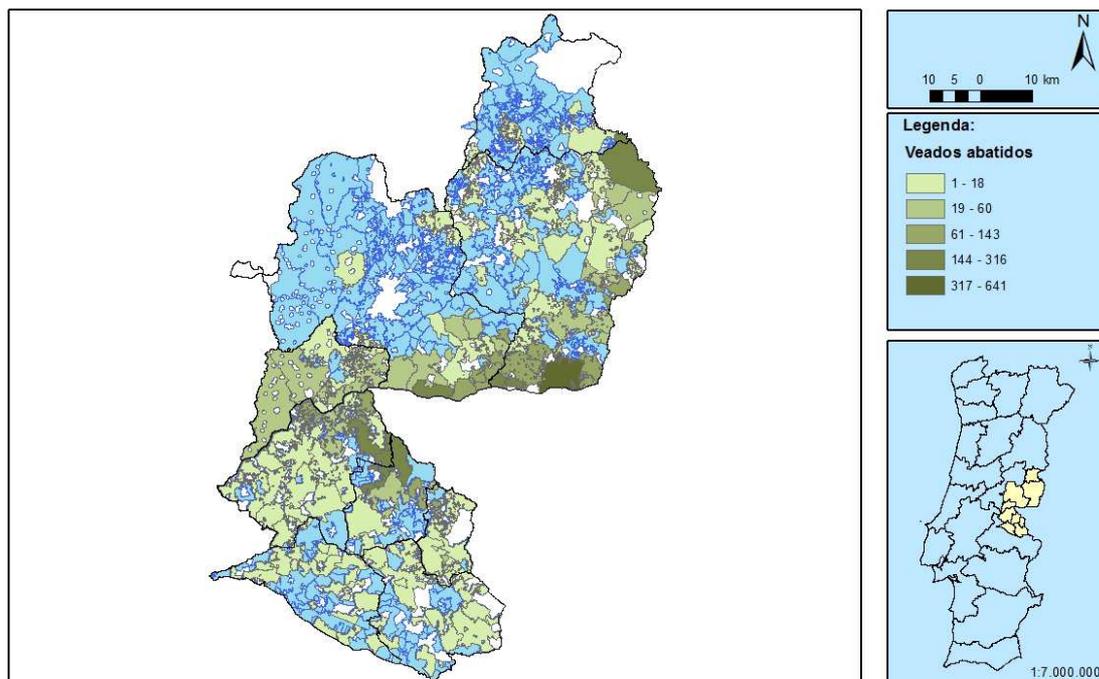


Figura 19 - Distribuição geográfica dos veados abatidos na área de estudo.

Para além da espécie dos animais abatidos também foram estudados parâmetros como o sexo e a idade. A idade era estabelecida de acordo com os padrões de erupção dentária, sendo os animais considerados jovens durante o primeiro ano de vida e adultos após superarem essa idade. Verificou-se que tanto em javalis como em veados foram caçadas, maioritariamente, fêmeas adultas, tal como se observa nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26 - Distribuição etária e sexual dos javalis abatidos, em número absoluto e FR (%; n=4030).

	Adultos	Jovens	Total	FR
<b>Macho</b>	1056	610	1666	41,3%
<b>Fêmea</b>	1653	711	2364	58,7%
<b>Total</b>	2709	1321	4030	100,0%
<b>FR</b>	67,2%	32,8%	100,0%	

Tabela 27 - Distribuição etária e sexual dos veados abatidos, em número absoluto e FR (%; n=5180).

	Adultos	Jovens	Total	FR
<b>Macho</b>	1709	459	2168	41,9%
<b>Fêmea</b>	2476	536	3012	58,1%
<b>Total</b>	4185	995	5180	100,0%
<b>FR</b>	80,8%	19,2%	100,0%	

#### 4.3.2) Caracterização dos animais rejeitados

As carcaças que apresentavam LSTB durante o exame inicial eram rejeitadas para o consumo humano, tendo sido rejeitados 413 carcaças de javali e 293 de veado. As tabelas 28 e 29 apresentam a taxa de rejeição em javalis e veados, em termos respetivos, nas sub-regiões em estudo.

Tabela 28 - Taxa de rejeição em javalis, por região e época venatória (%).

Região	2011-2012	2012-2013	2013-2014	Total
<b>AA</b>	4,3%	1,2%	4,4%	3,3%
<b>BIS</b>	16,7%	15,1%	15,8%	15,9%
<b>Total</b>	11,7%	8,2%	10,5%	10,2%

Tabela 29 - Taxa de rejeição em veados, por região e época venatória (%).

Região	2011-2012	2012-2013	2013-2014	Total
<b>AA</b>	1,2%	6,1%	3,0%	3,6%
<b>BIS</b>	5,9%	6,5%	7,2%	6,4%
<b>Total</b>	5,2%	6,4%	5,5%	5,7%

Como podemos constatar, a taxa de rejeição em javalis foi sempre superior à verificada nos veados, tendo a única exceção ocorrido na época 2012-2013 no AA. Da análise global dos dados, indicia-se que a probabilidade de um javali ser rejeitado é 1,9 vezes superior à de uma carcaça de um cervídeo ser rejeitada ( $p\text{-value} < 0,001$ ; IC a 95% [1,63; 2,23]).

Por outro lado, também se observa que a proporção de animais rejeitados na BIS superou sempre os valores obtidos na outra região. Ao analisar conjuntamente as duas espécies constatamos que a probabilidade de uma carcaça ser rejeitada na BIS é 3,1 vezes superior à probabilidade de rejeição no AA (*p-value* < 0,001; IC a 95% [2,52; 3,85]).

#### 4.3.3) Cálculo das prevalências

Entre as carcaças em que foram detetadas LSTB, não se procedeu ao envio de amostras para laboratório em 78 casos, o que demonstra que ocorre incumprimento por parte do médico veterinário designado em determinadas situações. Para contornar esta limitação, que nos impediria de calcular a prevalência da TB nas espécies cinegéticas, optou-se por calcular o valor preditivo positivo (VPP) da observação macroscópica na deteção da infeção com TB, aplicando-o depois aos animais em que não foi efetuado o envio de amostras, a fim de estimar o potencial número de amostras positivas.

Das 377 amostras de javali e 296 de veado enviadas para laboratório, foram consideradas positivas à TB, respetivamente, 258 e 275, obtendo-se um VPP do exame inicial de 68,4% em javalis e 92,9% em veados. O cálculo do OR mostra que a probabilidade de uma LSTB de veado vir a ter confirmação laboratorial é 6 vezes superior à dos javalis (*p-value* < 0,001; IC a 95% [3,63; 10,41]).

Os VPP calculados foram aplicados às amostras com resultados em falta, tal como demonstra a tabela 30.

Tabela 30 - Número estimado de casos, por espécie, região e época venatória.

Espécie	Região	2011-2012			2012-2013			2013-2014		
		Pos	Falta	Est	Pos	Falta	Est	Pos	Falta	Est
Javalis	AA	12	0	12	3	0	3	23	2	24
	BIS	93	15	103	53	9	59	74	10	81
Veados	AA	2	1	3	9	17	25	23	3	26
	BIS	88	16	103	73	1	74	80	4	84

Legenda: “Pos” – nº de amostras confirmadas laboratorialmente. “Falta” – nº de amostras não enviadas para o laboratório. “Est” – Estimativa do nº de casos, calculada através da soma das amostras com confirmação laboratorial com o número de amostras sem envio, multiplicada pelo VPP da observação macroscópica.

Desta forma, ficamos em condições de determinar a taxa de infeção da TB para as espécies cinegéticas, através do quociente entre o número estimado de casos e o número total de animais abatidos. A tabela 31 contém a prevalência da TB em javalis e veados nas duas regiões ao longo dos três anos.

Tabela 31 - Prevalência da TB em javalis e veado, por região e época venatória (%).

		2011-2012	2012-2013	2013-2014	Total
Javalis	AA	2,2%	0,5%	3,6%	2,2%
	BIS	12,4%	9,6%	10,5%	11,0%
Veados	AA	1,2%	5,9%	3,4%	3,8%
	BIS	6,9%	6,6%	7,5%	7,0%

A observação das linhas de tendência referentes aos javalis (gráfico 17) mostra que a prevalência na BIS está a decrescer, contrariamente ao que se verifica no AA. No caso dos veados, o gráfico 18 mostra que ambas as linhas de tendência têm um declive positivo, mas a situação na BIS está aparentemente mais controlada do que na outra sub-região, já que o AA apresenta um declive bastante pronunciado.

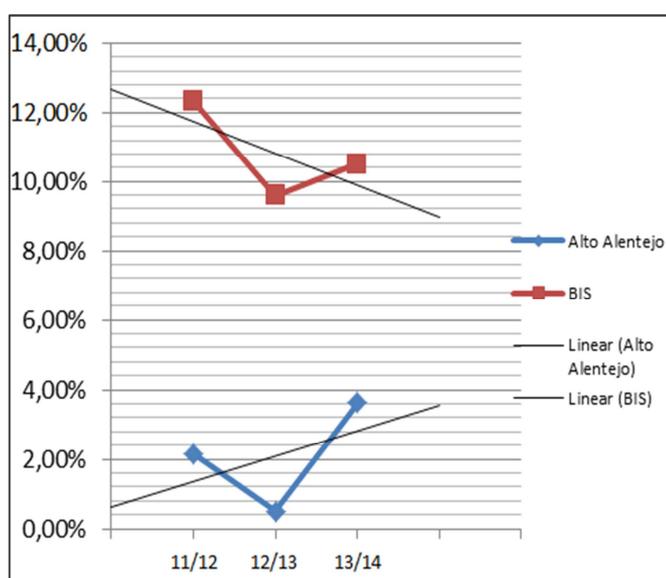


Gráfico 17 - Evolução da prevalência da TB em javalis, por região.

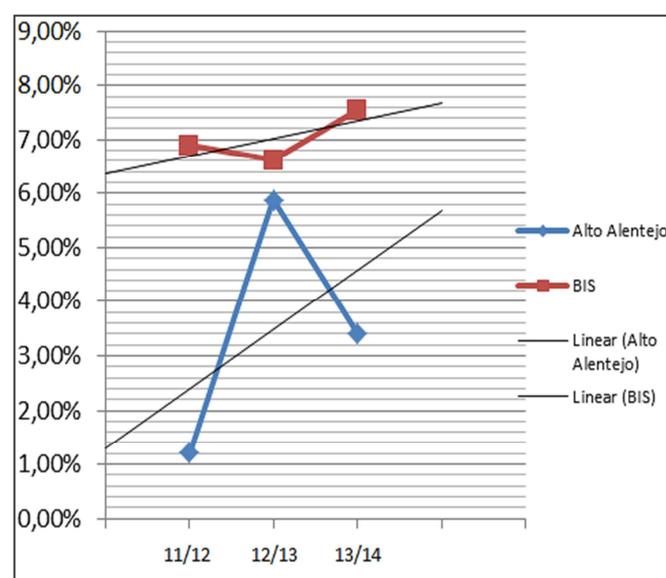


Gráfico 18 - Evolução da prevalência da TB em veados, por região.

O desenho deste estudo não tem em consideração a possibilidade de determinados animais estarem infetados com *M. bovis* e não apresentarem LSTB, ou seja, não considera a existência de falsos negativos. A tabela 32 apresenta os resultados de uma simulação das prevalências que seriam obtidas, caso se tivessem considerado os valores de sensibilidade referidos em Martín-Hernando *et al.* (2007) e Martín-Hernando *et al.* (2010).

Tabela 32 - Prevalências de TB estimadas por espécie e região (%)\*.

Região	Javalis	Veados
AA	18,9 %	32,0%
BIS	25,5 %	33,7%

\*Em conformidade com os resultados de Martín-Hernando *et al.* (2007) e Martín-Hernando *et al.* (2010), considerámos uma sensibilidade do exame inicial de 82,68 e 71,43% para javalis e veados, respetivamente.

#### 4.3.4) Variáveis de risco

Para determinar as variáveis que constituem risco para a infeção por *M. bovis*, foram estudados aspetos vários como a espécie, a idade e o sexo. A tabela 33 apresenta os resultados obtidos para as diferentes variáveis analisadas.

Tabela 33 - Estatística inferencial para determinação das variáveis que estão associadas à infeção por *M. bovis*.

Variáveis		Nº de positivos	Nº de negativos	p-value	OR e IC a 95%
Espécie (total)	Javalis	258	3772	< 0,05	1,22 [1,02; 1,46]
	Veados	275	4905		
Espécie (AA)	Javalis	38	1775	> 0,05	
	Veados	34	1403		
Espécie (BIS)	Javalis	220	1997	< 0,001	1,60 [1,32; 1,95]
	Veados	241	3502		
Idade (Javalis)	Adultos	201	2507	< 0,001	1,78 [1,31; 2,45]
	Jovens	57	1265		
Idade (Veados)	Adultos	248	3934	< 0,001	2,27 [1,5; 3,53]
	Jovens	27	971		
Sexo (javalis)	Machos	114	1551	> 0,05	
	Fêmeas	144	2221		
Sexo (veados)	Machos	113	2056	> 0,05	
	Fêmeas	162	2849		

Os javalis apresentaram um risco de infeção superior aos veados, ainda que o valor de OR não seja muito elevado (1,22) e a diferença só tenha sido verificada na BIS. Na análise da idade do animal, registou-se que o risco de infeção em adultos é consideravelmente superior ao dos jovens em ambas as espécies, sendo que os veados apresentaram um valor de OR de 2,27, enquanto nos javalis se ficou por 1,78. Relativamente ao sexo dos animais não foram verificados diferenciais estatisticamente significativos em qualquer das espécies.

#### 4.3.5) Definição das zonas de risco

No sentido de definir as zonas problemáticas para a TB em espécies de caça maior analisámos a proveniência das amostras consideradas positivas laboratorialmente. A tabela 34 mostra os Concelhos e Freguesias da BIS em que foi diagnosticada a presença de TB.

Tabela 34 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis e veados na BIS, em número absoluto e FR (%; n=461).

Concelho	Freguesia	Javalis			Veados			Total	FR
		11/12	12/13	13/14	11/12	12/13	13/14		
Castelo Branco	Malpica do Tejo	3	0	25	6	3	4	41	8,9%
	Monforte da Beira	13	9	12	8	5	7	54	11,7%
Idanha-a-Nova	Ladoeiro	2	0	0	0	0	0	2	0,4%
	Penha Garcia	6	1	3	2	0	0	12	2,6%
	Rosmaninhal	49	18	20	67	62	60	276	59,9%
	Idanha-a-Nova e Alcafozes	3	0	4	0	0	0	7	1,5%
	Monfortinho e Salvaterra do Extremo	9	4	2	1	0	0	16	3,5%
	Zebreira e Segura	7	13	5	2	2	8	37	8,0%
	Fratel	0	2	1	0	0	1	4	0,9%
Vila Velha de Ródão	Perais	1	6	2	1	0	0	10	2,2%
	Vila Velha de Ródão	0	0	0	1	1	0	2	0,4%

Após observação sumária da tabela anterior é notório que a maioria dos casos de TB ocorreu no Concelho de Idanha-a-Nova (75,9%), seguindo-se Castelo Branco (20,6%). Em termos de Freguesias, o Rosmaninhal destaca-se das restantes, sendo responsável por mais de metade dos casos detetados nesta sub-região. As Freguesias de Monforte da Beira, Malpica do Tejo e a união das Freguesias da Zebreira e Segura revelaram também alguns problemas de incidência da doença. Todas as Freguesias destacadas apresentaram casos de TB em ambas as espécies.

Nas figuras 20 e 21 é possível observar a evolução da distribuição dos casos de TB na BIS, em javalis e veados respetivamente.

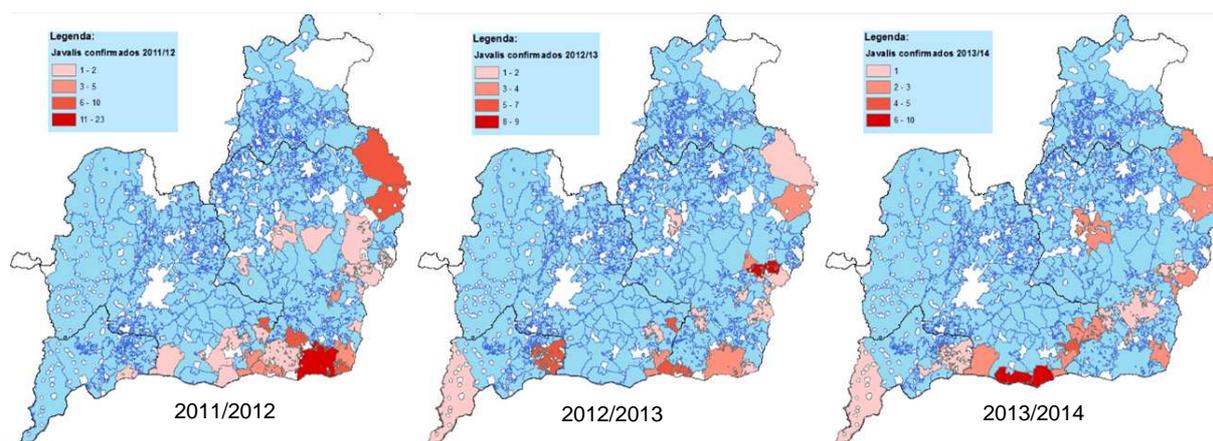


Figura 20 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis na BIS, por época venatória.

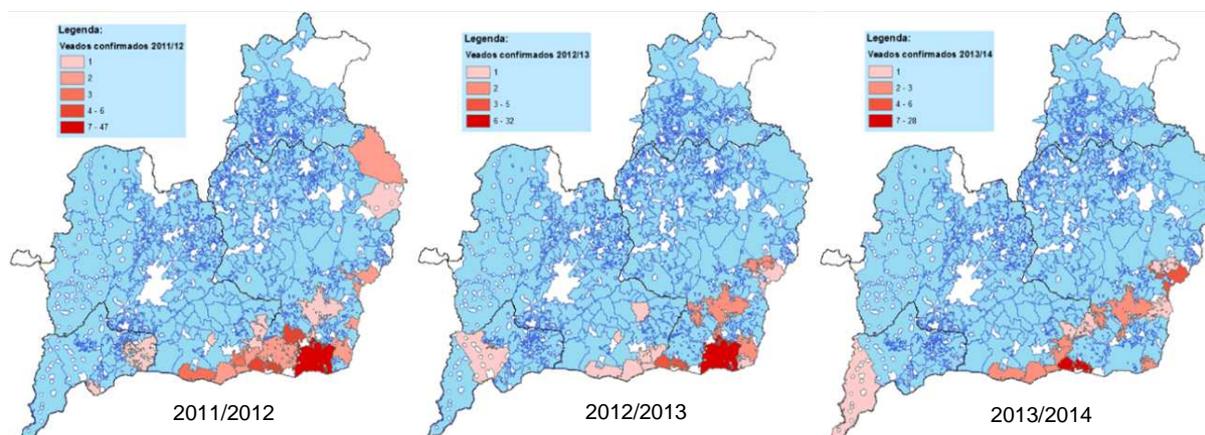


Figura 21 - Distribuição geográfica dos casos de TB em veados na BIS, por época venatória.

Ainda que existam diferenças nos padrões de distribuição espacial para as duas espécies, constata-se que os principais focos de doença em javalis e veados se localizam nos limites sul e este desta sub-região, coincidindo portanto com as zonas fronteiriças com o país vizinho.

Na zona do AA os casos de TB tiveram menor amplitude do que os registados na BIS, tal como se observa na tabela 35.

Tabela 35 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis e veados no AA, em número absoluto e FR (%; n=72).

Concelho	Freguesia	Javalis			Veados			Total	FR
		11/12	12/13	13/14	11/12	12/13	13/14		
Castelo de Vide	Póvoa e Meadas	0	1	0	0	6	2	9	12,5%
	Crato	1	0	0	0	0	0	1	1,4%
Marvão	Beirã	0	0	1	0	0	0	1	1,4%
	Espírito Santo	0	0	1	0	0	1	2	2,8%
Nisa	Montalvão	8	2	9	2	3	15	39	54,2%
	Santana	0	0	9	0	0	3	12	16,7%
	S. Matias	0	0	3	0	0	2	5	6,9%
Portalegre	Ribeira de Nisa	3	0	0	0	0	0	3	4,2%

No que respeita à sub-região AA, o Concelho de Nisa com 80,6% dos casos foi o principal foco de TB em caça maior, principalmente devido aos registos na Freguesia de Montalvão (54,2%), e de Santana (16,7%). O segundo Concelho com maior incidência da doença foi Castelo de Vide, embora estes se tenham restringido à Freguesia de Póvoa e Meadas, quase exclusivamente devido a casos em veados. Entre as Freguesias referidas, apenas Montalvão apresentou um número apreciável de casos tanto em javalis como em veados.

Nas figuras 22 e 23 é possível apreciar a evolução da distribuição espacial dos casos de TB no AA, em javalis e veados respetivamente.

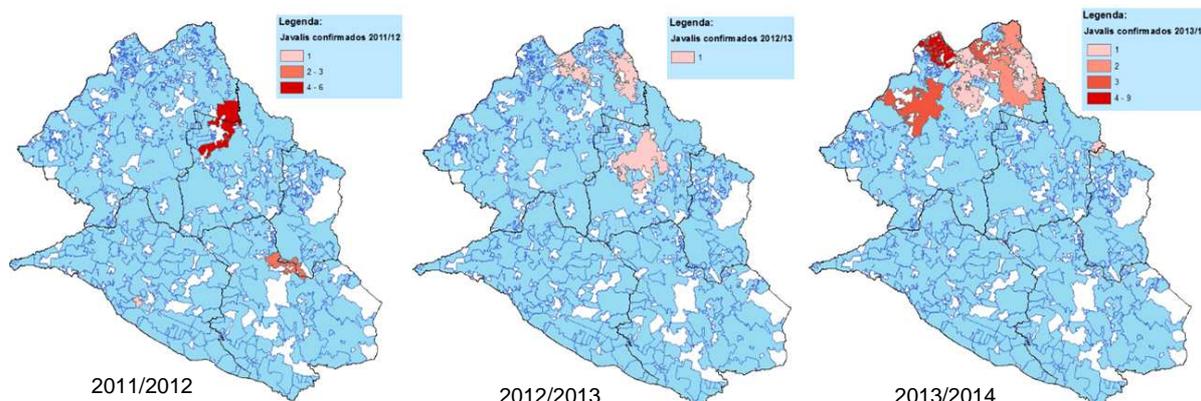


Figura 22 - Distribuição geográfica dos casos de TB em javalis no AA, por época venatória.

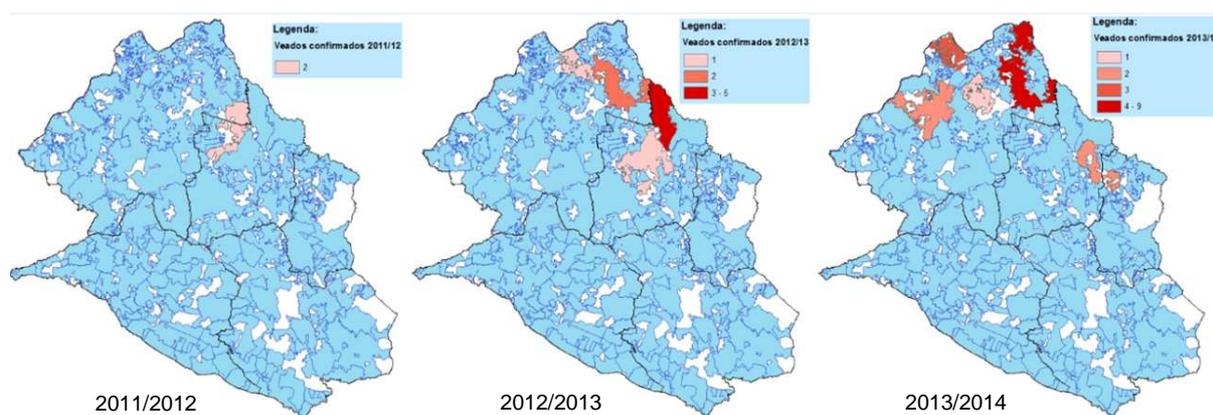


Figura 23 - Distribuição geográfica dos casos de TB em veados no AA, por época venatória.

A observação das figuras 22 e 23 mostra que para ambas as espécies se tem verificado um agravamento progressivo dos focos de TB no AA, já que a última época venatória foi a que apresentou o maior número de casos. O principal foco da doença ocorre no norte do AA, na Freguesia de Montalvão, pertencente ao município de Nisa. Esta Freguesia faz fronteira com a BIS a norte, sendo as duas áreas separadas pelo rio Tejo, e com Espanha a oeste, sem qualquer barreira física a separar as duas zonas.

#### 4.3.6) Isolamento bacteriano

Como a cultura é considerada a técnica de eleição no diagnóstico de TB, optou-se por analisar detalhadamente os resultados obtidos neste teste, estando a sua distribuição reportada nos gráficos 19 e 20. De referir que foram englobadas na categoria “outras micobactérias” todas as não pertencentes ao MTC ou MAC.

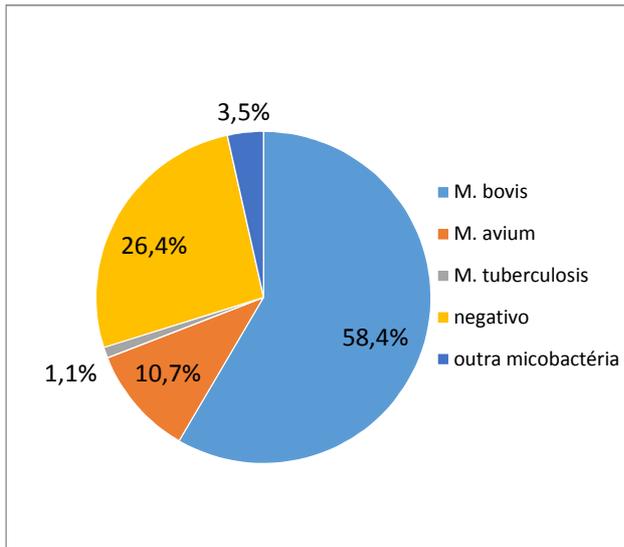


Gráfico 19 - Distribuição dos resultados do isolamento bacteriano em LSTB de javalis (%; n=375).

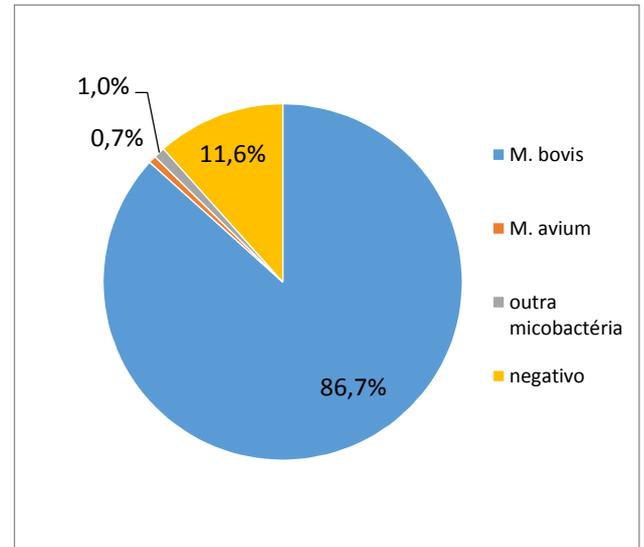


Gráfico 20 - Distribuição dos resultados do isolamento bacteriano em LSTB de veados (%; n=294).

O resultado do isolamento mais frequente foi o de *M.bovis* em ambas as espécies. Ainda assim, existem diferenças significativas entre estes ungulados, já que a probabilidade de isolamento do agente da TB em veados é cerca de 4,6 vezes superior à dos javalis ( $p\text{-value} < 0,001$ ; IC a 95% [3,1; 7,1]). A percentagem de isolamento de micobactérias não causadoras de TB em javalis (15,3%) foi muito superior ao valor obtido nos veados (1,7%) (OR=10,33;  $p\text{-value} < 0,001$ ; IC a 95% [4,1; 33,5]). Se compararmos apenas os dados de *M. avium* também obtemos uma grande diferença entre javalis (10,7%) e veados (0,7%) (OR=17,39;  $p\text{-value} < 0,001$ ; IC a 95% [4,4; 149,7]).

#### 4.3.7) Concordância dos testes laboratoriais

Como antes referimos, para que uma amostra seja considerada positiva à TB basta que apresente lesões características à histopatologia ou seja isolado o agente da TB. As tabelas 36 e 37 representam os resultados laboratoriais para as amostras de javalis e veados, respetivamente. É importante referir que 11 das amostras enviadas estavam prejudicadas, pelo que não foi possível efetuar um dos testes laboratoriais.

Tabela 3636 - Distribuição dos resultados das duas técnicas laboratoriais em javalis, em número absoluto (n=371).

		Histopatologia	
		Carac	Ñ Carac
Isolamento	+	200	17
	-	39	115

Tabela 37 - Distribuição dos resultados das duas técnicas laboratoriais em veados, em número absoluto (n=291).

		Histopatologia	
		Carac	Ñ Carac
Isolamento	+	247	6
	-	17	21

Legenda: "+" – Isolamento de *M. bovis*. "-" – Isolamento de uma micobactéria não causadora de TB ou sem qualquer isolamento. "Carac" – Histopatologia com imagem característica de TB. "Ñ Carac" – Histopatologia sem imagem característica de TB.

O teste *kappa* foi utilizado com o propósito de determinar o grau de concordância entre a histopatologia e o isolamento bacteriano. Assim, o valor obtido para os javalis foi ligeiramente superior (0,6826; IC 95% [0,6; 0,76]) ao valor dos veados (0,6031; IC 95% [0,46; 0,75]).

#### 4.3.8) Resultados da spoligotipagem

Outra técnica de diagnóstico laboratorial usada foi a spoligotipagem, embora por uma questão de controlo racional de custos a mesma tenha sido aplicada num escasso número de amostras. Das 23 análises realizadas, 20 foram realizadas em amostras provenientes do município de Idanha-a-Nova e as restantes três de Castelo Branco. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 38.

Tabela 37 - Resultados da spoligotipagem por espécie, em número absoluto (n=23).

Spoligótipos	Veado	Javali	Total
<b>SB0121</b>	2	0	2
<b>SB0122</b>	2	3	5
<b>SB0152</b>	1	0	1
<b>SB0265</b>	1	1	2
<b>SB1174</b>	1	2	3
<b>SB1195</b>	2	1	3
<b>SB1264</b>	2	3	5
<b>SB1265</b>	0	1	1
<b>SB1774</b>	1	0	1
<b>Total</b>	12	11	23

#### 4.3.9) Localização das LSTB

Entre as amostras consideradas positivas à TB, não foi possível determinar a localização específica de 42 lesões, por não ter sido preenchido corretamente esse campo no relatório enviado para o LNIV. No caso dos javalis, 90% das LSTB com confirmação laboratorial localizam-se na cabeça (gráfico 21), com importante contribuição dos Inn. submandibulares e retrofaríngeos, com 53,3% e 30,4% dos casos, respetivamente (tabela 39). No que respeita aos veados, a maioria das lesões estavam na cavidade abdominal (52,4%), logo seguida pela cavidade torácica (35,3%), como é patente no gráfico 22. As lesões dos veados encontram-se principalmente nos Inn. mesentéricos e pulmões, em 50,2 e 26,9% das situações respetivamente (tabela 40).

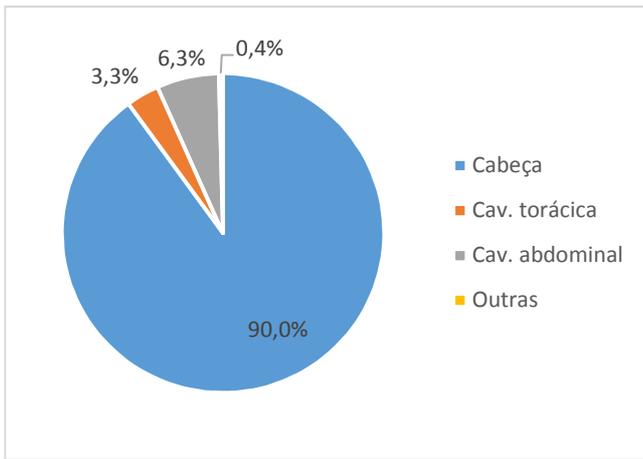


Gráfico 21 - Distribuição da localização das lesões em javalis com TB (%; n=240).

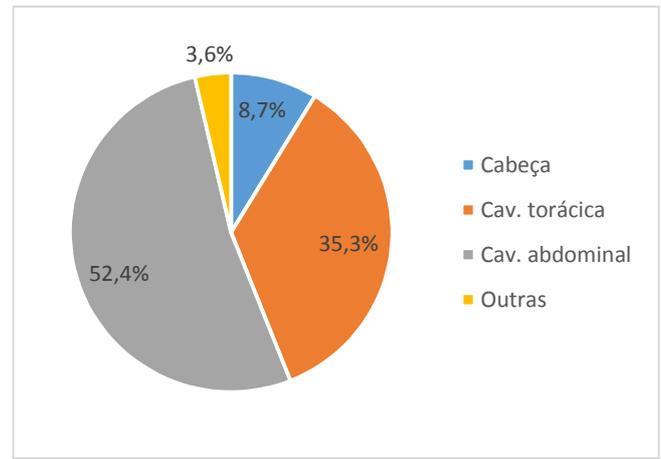


Gráfico 22 - Distribuição da localização das lesões em veados com TB (%; n=275).

Tabela 38 - Localização das LSTB em javalis, em número absoluto e FR (%; n=240).

Localização	Nº	FR
In. submandibular	128	53,3%
In. retrofaríngeo	73	30,4%
In. mesentérico	14	5,8%
In. parotídeo	11	4,6%
Pulmão	6	2,5%
In. sublingual	3	1,3%
In. mediastínico	2	0,8%
In. pré-escapular	1	0,4%
Fígado	1	0,4%
Glândula salivar	1	0,4%
<b>Total</b>	<b>240</b>	<b>100,0%</b>

Tabela 39 - Localização das LSTB em veados, em número absoluto e FR (%; n=275).

Localização	Nº	FR
In. mesentérico	138	50,2%
Pulmão	74	26,9%
In. retrofaríngeo	24	8,7%
In. mediastínico	13	4,7%
In. brônquico	9	3,3%
In. pré-crural	4	1,5%
In. pré-escapular	3	1,1%
In. hepático	3	1,1%
Fígado	3	1,1%
In. inguinal	2	0,7%
Rim	1	0,4%
Diafragma	1	0,4%
<b>Total</b>	<b>275</b>	<b>100,0%</b>

Analisou-se ainda a ocorrência de disseminação das lesões por mais de uma região anatômica, tal como se apresenta nos gráficos 23 e 24. A taxa de disseminação em veados foi superior à dos javalis (9,1 face a 6,2%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p\text{-value} > 0,05$ ).

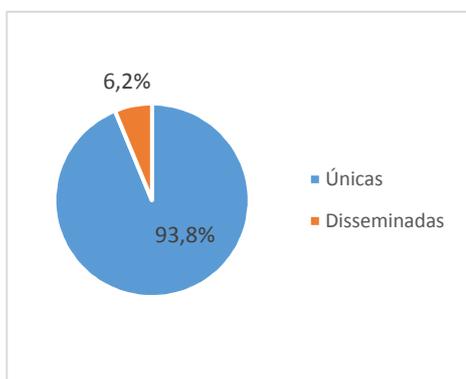


Gráfico 23 - Disseminação das LSTB em javalis (%; n=226).

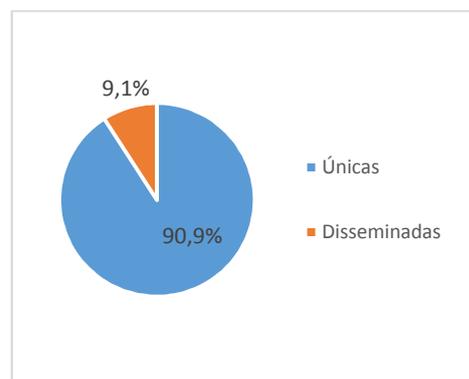


Gráfico 24 - Disseminação das LSTB em veados (%; n=252).

#### 4.4) Discussão

Durante o período de estudo verificou-se que o volume de abates na BIS superou sempre o verificado no AA, possivelmente pela maior tradição cinegética que ocorre na região beirão. Os veados foram a espécie mais caçada, ainda que no AA tenham sido os javalis a registar um maior número de abates. Os caçadores revelaram uma maior preferência na caça de fêmeas adultas em javalis e veados.

Relativamente ao número de abates em ambas as espécies, verificou-se que no AA a tendência foi crescente de ano para ano, contrariamente ao verificado na sub-região beirão. Desta forma, caso se mantenha esta tendência, é expectável que nos próximos anos o volume de abates no AA venha a superar o registado na BIS nas duas espécies de ungulados estudadas. Todavia, tal aspeto não deve ser sobrevalorizado pois a série temporal observada é relativamente curta (três anos), não garantindo uma extrapolação segura da tendência recente para o período posterior.

A taxa de rejeição registada nas carcaças de javali foi cerca de duas vezes superior à observada em veados. Ao comparar as duas regiões constatou-se que a probabilidade de rejeição de uma carcaça na BIS foi cerca de três vezes superior à registada no AA.

Após realizar os cálculos necessários para contornar a falta de alguns resultados laboratoriais, os javalis revelaram valores de prevalência de 2,2 e 11%, no AA e na BIS, respetivamente. Em veados, as prevalências correspondentes foram 3,8 e 7%. A prevalência da TB na sub-região beirão foi invariavelmente superior à verificada na sub-região alentejana, mas a tendência verificada sugere que a situação se possa inverter nos próximos anos em qualquer das espécies. Em javalis, a prevalência está a decrescer na BIS e a aumentar no AA. Nos veados regista-se uma tendência crescente em ambas as regiões, mas o incremento na região alentejana está a ser bastante mais pronunciado.

Os valores de prevalência apresentados não são muito elevados, contudo temos que ter em conta que o desenho deste estudo não teve em consideração o facto de determinados animais poderem estar infetados com *M. bovis* e terem alterações nos tecidos tão pequenas que não seja possível a sua observação durante o exame inicial. De facto, Martín-Hernando *et al.* (2007) constataram que entre os cadáveres de javali em que foi possível realizar o isolamento de *M. bovis*, apenas 82,68% apresentavam LSTB, correspondendo este valor à sensibilidade da observação macroscópica. Os restantes 17,32% constituem, portanto, falsos negativos já que não apresentam o quadro lesional típico da doença. Para os veados, Martín-Hernando *et al.* (2010) obtiveram uma sensibilidade inferior, situada em 71,43%. Assim, fizemos uma simulação das prevalências obtidas se as sensibilidades supracitadas se aplicassem à realidade do nosso estudo. As prevalências em javalis obtidas nessas condições situam-se nos 18,8 e 25,6%, enquanto para os veados foram 32 e 33,8%, no AA e na BIS, respetivamente. Salta à vista que estes são valores bastante elevados e preocupantes, no entanto seria

necessário averiguar se as sensibilidades utilizadas na simulação se aplicam ao contexto deste estudo. Deste modo, caso estes resultados se aproximem dos valores reais, constituem indicações alarmantes, principalmente no caso dos veados. É importante notar que não temos conhecimento de nenhum outro estudo realizado na PI que tenha sugerido valores de prevalência em veados superiores aos obtidos em javalis. Se a TB em veados apresentar uma prevalência de infecção efetivamente superior à verificada nos javalis, tornar-se-ia mais um argumento para validar a hipótese de serem os veados os principais reservatórios da doença no ecossistema mediterrânico, tal como apontam os trabalhos de Parra *et al.* (2006).

As nossas estimativas de prevalência de TB em veados são superiores à metaprevalência para a PI, calculada por Santos *et al.* (2012), que ronda os 21%. O mesmo estudo adianta que para os javalis o valor da metaprevalência se situa nos 36%, valor esse que é, ainda assim, superior à nossa estimativa. Entre as várias abordagens empíricas a esta temática não detetámos qualquer relato de ensaio realizado no AA, embora existam alguns referentes ao distrito de Castelo Branco, nomeadamente os trabalhos realizados por Santos *et al.* (2009) e Vieira-Pinto *et al.* (2011). Também cremos ser adequado analisar os valores referentes à Extremadura espanhola, região contígua à BIS e ao AA, calculados por Mendoza *et al.* (2006) e Parra *et al.* (2006). Na tabela 41 apresentamos de forma resumida os valores de prevalência de TB estimados nos vários estudos.

Tabela 40 - Dados de outros estudos semelhantes, realizados na PI.

<b>Autores</b>	<b>Área de estudo</b>	<b>Período</b>	<b>Prevalência (J)</b>	<b>Prevalência (V)</b>
<b>Mendoza <i>et al.</i> (2006)</b>	Extremadura (ES)	1992-2004	3,92%	1,09%
<b>Parra <i>et al.</i> (2006)</b>	Extremadura (ES)	1997-2002	1,81%	1,18%
<b>Santos <i>et al.</i> (2009)</b>	Castelo Branco	2005-2007	6,3%	NR
<b>Santos <i>et al.</i> (2009)</b>	Idanha-a-Nova	2005-2007	22,2%	NR
<b>Vieira-Pinto <i>et al.</i> (2011)</b>	Idanha-a-Nova	2008-2009	15,9%	10,3%

Legenda: J – Javalis; V – Veados; ES – Espanha; NR – Não realizado.

As diferenças na metodologia aplicada e no período temporal abrangido pelos vários estudos não permitem uma comparação estrita entre si, sendo no entanto possível adiantar que na sub-região BIS os valores de prevalência da TB em espécies de caça maior são elevados, tal como indicam os dados que coletámos. Os valores referentes à Comunidade Autónoma da Extremadura são bastante inferiores aos verificados em Portugal, sendo no entanto necessário ter em conta que os dois estudos referidos abrangem um período de tempo superior e os autores referem que os valores de prevalência apresentavam uma tendência de crescimento contínuo ao longo dos anos.

Relativamente às variáveis que podem constituir um risco para a TB, determinou-se que os javalis são a espécie mais predisposta à infecção por *M. bovis*, com a diferença entre espécies a acentuar-se na BIS. Santos *et al.* (2012) concluíram que as prevalências da TB nos javalis

superam as verificadas nos veados em toda a PI, pelo que estaria de acordo com os nossos resultados. Não nos podemos no entanto esquecer que quando simulámos a prevalência de maneira a colmatar as lacunas do desenho deste estudo determinámos que a prevalência em veados superaria a dos javalis.

Quanto à idade, registou-se que o risco de infeção em adultos é consideravelmente superior ao dos jovens em ambas as espécies, estando de acordo com Vicente *et al.* (2006), os quais referem que o aumento da prevalência com o avançar da idade é uma característica das doenças de evolução crónica devido à crescente probabilidade de infeção ao longo da vida. Porém, Santos *et al.* (2009) concluíram que a taxa de infeção em javalis juvenis era superior à dos adultos. No que ao sexo diz respeito não verificámos qualquer diferença estatisticamente significativa em javalis ou veados, o que está em conformidade com os resultados obtidos em várias pesquisas. Ainda assim, Vicente *et al.* (2006) constataram que no caso dos cervídeos a prevalência é superior em machos, pelo seu comportamento sexual, e Santos *et al.* (2009) referem que nos javalis são as fêmeas as mais predispostas, devido ao seu comportamento social que as faz viver em grupo, aumentando a possibilidade de transmissão de *M. bovis*.

No território da BIS, a maioria dos animais foi abatida em Idanha-a-Nova e Castelo Branco, com as Freguesias do Rosmaninhal, Malpica do Tejo, Penha Garcia, Monforte da Beira e a união das Freguesias de Zebreira e Segura a serem aquelas onde se caçaram mais animais. Nesta sub-região, as Freguesias com mais casos de TB foram quase sempre as mesmas anteriormente referidas, sendo que Penha Garcia foi a única exceção pois teve um reduzido número de confirmações laboratoriais. Interessa referir que as quatro Freguesias destacadas com mais casos de doença apresentaram um número considerável de casos tanto em javalis como em veados. Esta observação de que os principais focos de TB para ambas as espécies coincidem está de acordo com o referido em Santos *et al.* (2012), que afirmam que a abundância de casos de TB numa das espécies é um fator de risco para a infeção por *M. bovis* na outra espécie.

Na região doo AA, nem o volume de abates nem o número de casos de TB tiveram a expressão verificada na outra sub-região. Os Concelhos de Nisa e Castelo de Vide foram os que tiveram mais animais abatidos e mais confirmações laboratoriais, sendo as freguesias de Montalvão, Santana e Póvoa e Meadas aquelas em que a doença apresentou maior dimensão. Destas, apenas Montalvão apresentou um número apreciável de casos tanto em javalis como em veados. O município do Crato, o terceiro com maior número de animais caçados na sub-região, apenas apresentou um javali infetado com *M. bovis*.

A análise conjunta das áreas em que foram caçados mais animais e daquelas em que houve um maior número de casos de TB, confirmados laboratorialmente, permite constatar que existe uma forte similaridade entre os dois grupos. Esta estreita relação observada reforça a

convicção de que a transmissão da doença tem sido facilitada pelas elevadas densidades populacionais, como de resto sustentam Skuce *et al.* (2012).

A observação dos mapas que comparam a distribuição geográfica dos casos de TB nos três anos do estudo mostra que a situação é diferente nas duas sub-regiões. Na BIS a doença apresenta uma expressão bastante significativa nos limites sul e este da região. Ainda assim a área afetada pela TB não se expandiu ao longo do período de estudo. O maior número de casos para as duas espécies tem sido registado no Rosmaninhal, localizado no sul do Concelho de Idanha-a-Nova. No AA tem-se verificado um agravamento progressivo dos casos de doença de ano para ano, com particular importância no norte da região, destacando-se a Freguesia de Montalvão, que faz fronteira com a BIS a norte e com Espanha a este. Curiosamente, os mapas construídos com recurso aos SIG mostram que os principais focos de cada região ocorreram em zonas fronteiriças, apesar dos estudos de Mendoza *et al.* (2006) e de Parra *et al.* (2006) apresentarem valores de prevalência na Extremadura espanhola muito inferiores aos observados na área circunscrita no nosso estudo.

A comparação dos resultados do exame inicial e das provas laboratoriais comprovou que a probabilidade de as LSTB de veados terem confirmação laboratorial é seis vezes superior à dos javalis. Este facto demonstra que nos javalis não é muito seguro afirmar que determinada lesão se deve à TB, apenas através da observação macroscópica, enquanto a LSTB em veados parece ser quase patognomónica já que mais de 90 % delas forneceram um resultado positivo em pelo menos uma das provas laboratoriais.

Relativamente aos resultados da cultura, não se verificou qualquer isolamento de *M. caprae* no período de estudo, apesar deste também ser um dos agentes da TB (Aranaz *et al.*, 1999). O resultado do isolamento mais frequente foi o de *M. bovis* em ambas as espécies, situação essa expectável uma vez que só foram analisadas amostras suspeitas. Ainda assim, existem diferenças significativas entre os dois ungulados, já que a probabilidade de isolamento do agente da TB em veados foi quase cinco vezes superior à dos javalis. Para este facto foi relevante a quantidade de isolamentos de micobactérias não causadoras de TB, cujo valor em javalis ronda os 15,3% e em veados se situa em 1,7%, podendo-se admitir que nos cervídeos as restantes micobacterioses não parecem constituir um diagnóstico diferencial relevante. O valor correspondente apresentado por Parra *et al.* (2006), referente às duas espécies em simultâneo, ronda os 7,2%, estando portanto entre os valores que obtivemos.

O facto de apenas em 0,7% das LSTB de veados ter sido isolado um agente pertencente ao MAC está de acordo com o referido nos trabalhos de Coelho *et al.* (2014), que afirmam que para esta espécie a infeção por *M. avium* é auto-limitante. No javali, passa-se o oposto, uma vez que o facto de em 10,7% das LSTB ter sido isolado um agente pertencente ao MAC permite confirmar que as infeções com estas bactérias são um dos principais diagnósticos diferenciais para a infeção com *M. bovis*. Estas conclusões sustentam a hipótese de que, para

javalis, as lesões causadas por um agente pertencente ao MAC só podem ser distinguidas das originadas por *M. bovis* caso sejam usadas técnicas como a bacteriologia ou o PCR, uma vez que as lesões são indiferenciáveis anatomicamente. Esta posição é corroborada pelos trabalhos de Coelho *et al.* (2013) e Muñoz-Mendonza *et al.* (2013). Todavia, Boadella *et al.* (2011) suportam que as infeções por MAC provocam lesões histológicas mínimas, pelo que não deveriam ser observadas macroscopicamente.

Os valores de *kappa* calculados para a concordância entre a histopatologia e o isolamento bacteriano (0,7 para javalis e 0,6 para veados) confirmam que existe uma concordância satisfatória entre ambas, de acordo com Landis & Koch (1977), onde uma concordância perfeita teria *kappa*=1. Como a bacteriologia é a técnica de eleição no diagnóstico de TB (Santos *et al.*, 2009; Muñoz-Mendonza *et al.*, 2013), os valores de concordância obtidos confirmam-nos que a histopatologia também é uma técnica válida no diagnóstico da doença.

Para além da histopatologia e do isolamento bacteriano ainda foi realizada uma terceira técnica laboratorial, a spoligotipagem, se bem que o limitado número de amostras em que foi aplicada restringe o alcance das conclusões que poderiam ser retiradas. Ainda assim é possível afirmar que na região da BIS há circulação de algumas estirpes de *M. bovis* (SB0121, SB0122, SB0265 e SB1174) nas espécies cinegéticas, as quais já foram isoladas em bovinos, tal como descrito por Duarte *et al.* (2008). Esta parece ser uma evidência indiscutível sobre a ocorrência de transmissão do agente etiológico da TB entre os bovinos e as espécies silváticas.

Alberto (2009) desenvolveu um estudo no município de Idanha-a-Nova, tendo realizado spoligotipagem numa quantidade de amostras consideravelmente superior à nossa. Dois dos spoligótipos que detetámos nessa área foram o SB1265 e o SB1774, apesar de Alberto (2009) não os ter detetado na sua amostra. Uma possibilidade alvitrada para este facto é que estes padrões sejam recentes, tendo evoluído a partir de mutações ocorridas noutras estirpes.

Em javalis, 90% das LSTB com confirmação laboratorial localizaram-se na cabeça, com especial destaque para os Inn. submandibulares e retrofaríngeos, com 53,3% e 30,4% dos casos, respetivamente. Estas conclusões são concordantes com os resultados apresentados por Martín-Hernando *et al.* (2007) e Vieira-Pinto *et al.* (2011), em que as lesões se localizam mais frequentemente nos Inn. da cabeça, em especial no submandibular. Todavia, o primeiro estudo identifica os pulmões como a segunda localização, algo que no nosso estudo não se revelou frequente, ocorrendo somente em 2,5% dos casos. A reduzida expressão das lesões pulmonares nos javalis parece indicar que nesta espécie a infeção por via digestiva tem maior relevância, o que pode acontecer devido aos hábitos necrófagos destes animais, possibilitando a ingestão de elevadas quantidades de micobactérias ao alimentarem-se de vísceras ou carcaças infetadas, tal como defendem Aranaz *et al.* (2004), Naranjo *et al.* (2008) e Zanella *et al.* (2008). No último estudo aponta-se mesmo que a principal fonte de infeção em javalis são

as carcaças de veados infetados com *M. bovis*, já que estes apresentam uma elevada taxa de disseminação pelo organismo.

Quanto aos veados, a maioria das lesões estavam na cavidade abdominal (52,4%) ou na cavidade torácica (35,3%). As três principais localizações anatómicas foram os Inn. mesentéricos, os pulmões e os Inn. retrofaríngeos, com 50,2, 26,9 e 8,7% das situações, respetivamente. Estas localizações principais estão de acordo com as conclusões obtidas por Zanella *et al.* (2008), Martín-Hernando *et al.* (2010) e Vieira-Pinto *et al.* (2011), ainda que a importância atribuída a cada uma das regiões anatómicas tenha registado variações entre os estudos. O nosso estudo evidencia que nesta espécie a infeção pode ocorrer tanto por via aerógena como digestiva. Martín-Hernando *et al.* (2010) defendem que a via respiratória é a principal, mas os motivos que levam ao aparecimento de LSTB a nível mesentérico não estão completamente esclarecidos, uma vez que esta espécie não é necrófaga. As principais hipóteses apontam para estas lesões aparecerem após um processo de disseminação pelo organismo ou após deglutição de saliva contaminada.

Os órgãos onde são detetadas as LSTB estão diretamente relacionados com a via pela qual foi adquirida a infeção (Zanella *et al.*, 2008), pelo que as diferenças na localização das lesões observadas em diferentes contextos podem ser explicadas pelos fatores ambientais de cada local (Parra *et al.*, 2006), não sendo de estranhar que os diferentes estudos cheguem a diferentes conclusões.

Os valores de disseminação das lesões nas duas espécies foram reduzidos (ainda que ligeiramente superiores para os veados), não obstante acreditarmos que na realidade possam ser superiores, pois alguns médicos veterinários executores podem interromper a inspeção da carcaça após encontrarem uma LSTB, não pesquisando a existência de lesões noutros órgãos.

No caso dos javalis, obtivemos uma baixa taxa de disseminação das LSTB, sendo bastante diferente do valor referido por Martín-Hernando *et al.* (2007), em que cerca de 60% dos javalis apresentaram disseminação das lesões. Contudo, o estudo de Vieira-Pinto *et al.* (2011) refere que na população analisada nenhum javali apresentou LSTB em mais do que uma localização. Para os veados, o valor que obtivemos é idêntico ao registado por Vieira-Pinto *et al.* (2011), apontando para uma taxa de disseminação de 12,5%. Porém, estes valores são significativamente inferiores aos obtidos por Martín-Hernando *et al.* (2010) que rondam os 46,4%.

A maior ocorrência de disseminação em veados, ainda que não revele uma diferença significativa para a outra espécie, é indicativa de que o sistema imunitário desta espécie lhe confere uma menor resistência à TB em comparação com os javalis, tal como é defendido por Zanella *et al.* (2008). Esta é mais uma evidência bastante forte de que os veados podem desempenhar um papel muito importante como verdadeiros hospedeiros de manutenção da TB no ecossistema mediterrânico.

#### 4.5) Conclusão

O presente estudo permite-nos confirmar de forma expressiva a presença de TB em javalis e veados nas áreas geográficas abrangidas. Em ambas as sub-regiões tratadas tem existido uma forte tradição de caça destes ungulados silvestres, o que justificou a nossa opção pelo estudo desta área geográfica. É ainda importante notar que os resultados considerados só se referem às montarias reportadas à DIV, não havendo qualquer contemplação das esperas realizadas ou das caçadas organizadas furtivamente. Acredita-se que, se os dados referentes a esses atos cinegéticos fossem conhecidos, obteríamos conclusões ainda mais alarmantes.

Os resultados deste trabalho constituem mais uma evidência de que parecem ser os veados os reservatórios silváticos da TB para os bovinos no contexto ibérico, tal como já apontavam os trabalhos de Parra *et al.* (2006). A principal evidência por nós reportada que aponta nesse sentido é a possibilidade de os veados apresentarem uma prevalência superior à dos javalis. Outras evidências de que os veados têm maior potencial disseminador da infeção comparativamente com os javalis, já reportadas noutros estudos, são a maior percentagem de disseminação das lesões, o grande número de lesões pulmonares, a predominância de lesões com liquefação do cáseo (com maior potencial disseminador) e a presença de elevadas quantidades de bacilos viáveis nas LSTB (Parra *et al.* 2006; Zanella *et al.* 2008; Vieira-Pinto *et al.* 2011). Estes são indicadores de que os veados são bastante sensíveis à infeção por *M. bovis*, contrariamente ao verificado nos javalis, em que o seu sistema imunitário promove uma resposta mais eficaz, comprovada pelas elevadas percentagens de calcificação e encapsulamento das lesões e pelo reduzido número de formas infetantes viáveis nas LSTB (Zanella *et al.* 2008; Vieira-Pinto *et al.* 2011). Outro argumento, não menos importante, é o facto de frequentemente serem observados bovinos e veados a partilharem pastagens no mesmo espaço temporal, algo que é pouco provável para o caso dos javalis. Este íntimo contacto verificado possibilita a ocorrência de infeção dos bovinos por via respiratória. Acreditamos assim que as autoridades competentes devam focar-se essencialmente na remoção da doença nos veados, já que se eles forem os verdadeiros hospedeiros de manutenção, a eliminação da infeção nessa espécie acabaria por resultar na remoção da doença nas espécies hospedeiras acidentais.

Como já referimos, os elevados custos associados à aplicação de técnicas de diagnóstico laboratorial tornam inexequível a observação de amostras de todas as carcaças. Porém, seria recomendável, e cremos que viável, que fossem recolhidas aleatoriamente amostras de animais que não apresentassem LSTB, a fim de estimar a sensibilidade da observação macroscópica. Esta parece ser uma medida adequada para contrariar a limitada eficácia da observação macroscópica de lesões. As amostras deveriam ser coletadas dos órgãos onde é mais frequente isolar o agente da TB, o que, segundo o nosso estudo, parecem ser os lnn. submandibulares e retrofaríngeos, no caso dos javalis, e os lnn. mesentéricos e pulmão, no que aos veados respeita.

A expressão territorial dos focos de TB indica-nos que o grau de perigosidade não é homogéneo ao longo de toda a área epidemiológica de risco, pelo que parece ser o momento apropriado para redesenhar essa área, após ter sido completado um triénio desde a implementação do *Edital nº1*. Com efeito, os elementos que obtivemos apontam para o facto de o risco ser quase irrelevante nos Concelhos do Crato, Marvão, Penamacor e Portalegre. Em contrapartida, são reconhecidos relatos fiáveis da presença de casos de TB em territórios que atualmente não são abrangidos pelo *Edital nº1*, pelo que se torna indispensável avaliar o risco nas zonas geográficas adjacentes aos focos de TB.

A situação na sub-região da BIS parece ser mais preocupante que a verificada no AA, não só devido aos superiores valores de prevalência da doença, mas também devido ao número de animais caçados ser bastante superior nesta região, sugerindo naturalmente a existência de uma maior densidade populacional. Ainda assim, a situação no AA parece ter vindo a agravar-se progressivamente ao longo do último triénio, o que reclama a tomada de medidas preventivas em tempo útil para evitar a propagação da doença para os níveis da região contígua analisada.

Para diminuir o risco de transmissão da TB das espécies silváticas para os bovinos acreditamos ser necessário que os proprietários das explorações disponham de condições para investir na melhoria das vedações e separar de forma adequada os locais de alimentação de ambas as espécies, a fim de minimizar a interação entre elas. Nos principais focos de TB, nomeadamente nos municípios de Idanha-a-Nova, Castelo Branco e Nisa, seria mesmo desejável que não se suplementasse a alimentação das espécies de caça maior e fossem promovidas ações de despovoamento desses ungulados silvestres, o que promoveria uma redução da respetiva densidade populacional, a qual constitui um dos principais fatores de risco para a transmissão por via respiratória (Skuce *et al.*, 2012). No caso do javali, em que a transmissão por via digestiva assume uma importância fulcral, entendemos que é crucial que se realize uma correta eliminação das carcaças e das vísceras rejeitadas ao consumo humano, de forma a quebrar a perpetuação do ciclo de transmissão.

Outra alternativa que poderá vir a ser implementada num futuro próximo, e que segundo o nosso conhecimento ainda não ocorreu no nosso país, é a aplicação de testes de diagnóstico em vida. Este tipo de medidas já revelou resultados bastante satisfatórios noutros contextos (Gowtage-Sequeira *et al.*, 2009; Boadella *et al.*, 2011) e tem como principais vantagens eliminar apenas animais infetados, em alternativa à realização de ações de despovoamento indiscriminado em toda a população.

Os dados analisados na nossa abordagem podem fornecer informações bastante significativas para apoio à decisão sobre a forma mais adequada para atuar face à dificuldade em erradicar a TB em Portugal. Todavia, estamos convictos de que as conclusões mais relevantes só poderão ser obtidas se entretanto for feita uma análise mais ampla que conjugue estes dados com os

facultados pelas explorações de bovinos, o que se justifica face ao objetivo maior deste trabalho que era retirar indicações que constituíssem um auxílio na erradicação da doença na espécie bovina. Para tal julgamos que será também imprescindível aplicar as técnicas de epidemiologia molecular num superior número de amostras e analisá-las conjuntamente com os dados dos bovinos.

A DGAV e o *Clube Português de Monteiro*s têm organizado vários seminários de divulgação e de informação técnica sobre a temática da TB em espécies de caça maior nas várias regiões onde o fenómeno persiste. Este tipo de iniciativas tem bastante interesse para o esclarecimento dos múltiplos agentes que intervêm no processo. Em outro plano, também a *Ordem dos Médicos Veterinários* tem promovido cursos de formação na área da inspeção sanitária de espécies cinegéticas, o que se revela uma mais-valia para esta classe profissional e naturalmente para as entidades que recorrem aos seus serviços

Na nossa opinião, cremos que nem todos os médicos veterinários estão devidamente alertados para a real dimensão do problema que representa a TB nas espécies de caça maior e quais as implicações que pode ter na erradicação da doença dos bovinos. Em termos gerais, foram por nós identificadas várias limitações durante a análise dos dados, sendo de destacar as seguintes:

- ✓ Ausência de uniformização dos procedimentos de inspeção das carcaças pelos vários executores;
- ✓ Realização de inspeções incompletas, o que impossibilita averiguar o espetro de disseminação das lesões pelo organismo;
- ✓ Falta de envio das remessas de LSTB para análise laboratorial;
- ✓ Procedimentos pouco rigorosos na identificação de algumas amostras enviadas;
- ✓ Envio de amostras para laboratório em condições que inviabilizam o seu correto processamento.

Naturalmente que estas lacunas e omissões nos procedimentos podem ser corrigidas com alguma coordenação de esforços dos agentes envolvidos, desde que os devidos alertas e recomendações sejam transmitidos em tempo útil.

Finalmente, cremos também ser importante estar consciente que o facto de a área de risco ser adjacente à fronteira com Espanha, requer esforços de coordenação adicionais envolvendo as entidades dos dois países, pois a permeabilidade da região raiana aos movimentos dos animais no território transfronteiriço recomenda uma monitorização mais apertada. Em suma, a resolução do problema só poderá ser alcançada se em ambos os países forem promovidas, de forma adequada, campanhas de sensibilização destinadas a toda a população alvo e se os intervenientes envolvidos (públicos e privados) atacarem o problema de forma integrada e não com medidas avulsas.

## 5) Bibliografia

- Alberto, J. (2009). Study of Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in large game hunted in Idanha-a-Nova county. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Antunes, G. (2008). Hemoparasitoses em Bovinos de carne. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G. & Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis complex* isolated from goats in Spain. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 49, 1263–1273.
- Aranaz, A., Juan, L. De, Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A., Briones, V., Mateos, A. & Domínguez, L. (2004). Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2602–2608.
- Authie, E., Berg, C., Botner, A., Browman, H., Capua, I., Koeijer, A., Depner, K., Domingo, M., Edwards, S., Fourichon, C., Koenen, F., More, S., Raj, N., Sihvnonen, L., Spoolder, H., Stegeman, J. A., Thulke, H., Vagsholm, I., Velarde, A. & Zientara, S. (2013). Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination 1. *EFSA Journal*, 11(12), 1–35.
- Bettencourt, E. & Romão, R. (2013). Texto de apoio à disciplina de Clínica de espécies pecuárias. Universidade de Évora.
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P. & Rigby, S. L. (2003). *Manual of Equine Reproduction*. (2<sup>nd</sup> ed.). Philadelphia: Mosby.
- Boadella, M., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Esfandiari, J., Jaroso, R., Carta, T., Garrido, J. M., Vicente, J., de la Fuente, J. & Gortazar, C. (2011). Serologic Tests for Detecting Antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in Eurasian Wild Boar (*Sus Scrofa Scrofa*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 77–83.
- Buddle, B. M., Wilson, T., Denis, M., Greenwald, R., Esfandiari, J., Lyashchenko, K. P., Liggett, S. & Mackintosh, C. G. (2010). Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17(4), 626–30.
- Coelho, A. C., Pinto, M. L., Matos, A., Matos, M., Pires, M. A., 2013. *Mycobacterium avium complex* in Domestic and Wild Animals, in: Payan Carreira, R. (Ed.), *Insights from Veterinary Medicine*. InTech.

Corner, L. L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4), 303–12.

Cortes, H., Chagas e Silva, J., Baptista, M. C., Pereira, R. M., Leitão, A., Horta, A. E. M., Vasques, M. I., Barbas, J. P. & Marques, C. C. (2006). *Besnoitia besnoiti* impact on fertility of cattle exploited in Mediterranean pastures (Alentejo). *Animal Products from the Mediterranean Area*, (119), 323–329.

Crabtree, J. (2010). Prebreeding examination of the stallion: 2. Semen collection and evaluation. *In Practice*, 32(2), 58–63.

Crespo, J. (2014). Exame em Acto de Compra do cavalo para utilização desportiva. Apresentado nas *II Jornadas Multidisciplinares da AEMVUE*. Évora.

Cunha, M. V, Monteiro, M., Carvalho, P., Mendonça, P., Albuquerque, T., & Botelho, A. (2011). Multihost tuberculosis: insights from the portuguese control program. *Veterinary Medicine International*.

Cunha, M. V, Matos, F., Canto, A., Albuquerque, T., Alberto, J. R., Aranha, J. M., Vieira-Pinto, M. & Botelho, A. (2012). Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: a molecular epidemiology perspective. *Research in Veterinary Science*, 92(2), 225–35.

Decreto-Lei nº 46/1989 de 15 de fevereiro. *Diário da República nº 38/1989 – I Série*. Ministério do Planeamento e da Administração do Território. Lisboa. Acedido em 9/7/2014, em:

<http://dre.pt/pdf1s/1989/02/03800/05900594.pdf>

Decreto-Lei nº 244/2000 de 27 de setembro. *Diário da República nº 224/2000 – I Série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Acedido em 9/7/2014, em:

<http://www.dre.pt/pdf1s/2000/09/224A00/52075223.pdf>

Decreto-Lei nº 272/2000 de 8 de novembro. *Diário da República nº 258/2000 – I Série*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Acedido em 19/6/2014, em:

<http://www.dre.pt/pdf1s/2000/11/258A00/62306235.pdf>

DGAV. (2011). Edital nº 1 Tuberculose em Caça Maior de 29 de abril de 2011. *Direção Geral de Alimentação e Veterinária*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Acedido em 19/6/2014, em:

<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=2199530&generico=2199206&cbo-ui=2199206>

DGAV. (2013a) – Plano de erradicação da tuberculose bovina 2014. *Direção Geral de Alimentação e Veterinária*. Lisboa. Acedido em 15/6/2014, em:

<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667381&generico=20291&cboui=20291>

DGAV. (2013b) - Plano de erradicação da brucelose dos bovinos 2014. *Direção Geral de Alimentação e Veterinária*. Lisboa. Acedido em 20/6/2014, em:

<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667381&generico=20291&cboui=20291>

DGAV. (2013c) - Plano de erradicação da brucelose dos pequenos ruminantes 2014. *Direção Geral de Alimentação e Veterinária*. Lisboa. Acedido em 20/6/2014, em:

<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667381&generico=20291&cboui=20291>

DGAV. (2014) - Lista das doenças de declaração obrigatória a nível nacional. *Direção Geral de Alimentação e Veterinária*. Lisboa. Acedido em 13/7/2014, em:

[www.dgv.min-agricultura.pt/%2Fxeov21%2Fattachfileu.jsp%3Flook\\_parentBoui%3D2130110%26att\\_display%3Dn%26att\\_download%3Dy&ei=HhvsU\\_Lul8Sp0QXMxYAl&usq=AFQjCNFBm2roPX7hK37PYyULbOMGbyvXHW&bvm=bv.72938740,d.d2k](http://www.dgv.min-agricultura.pt/%2Fxeov21%2Fattachfileu.jsp%3Flook_parentBoui%3D2130110%26att_display%3Dn%26att_download%3Dy&ei=HhvsU_Lul8Sp0QXMxYAl&usq=AFQjCNFBm2roPX7hK37PYyULbOMGbyvXHW&bvm=bv.72938740,d.d2k)

Duarte, E. L., Domingos, M., Amado, a, & Botelho, a. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 130(3-4) 415-421.

Duarte, E. L., Domingos, M., Amado, a, Cunha, M. V, & Botelho, A. (2010). MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4), 299–306.

Duro, L. (2010). Parasitismo Gastrointestinal em Animais da Quinta Pedagógica dos Olivais: Especial Referência aos Mamíferos Ungulados. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (p. 90).

Eiler, H. & Fecteau, K. A. (2007). Retained placenta. In *Current therapy in large animal theriogenology*. (2<sup>nd</sup> ed.). Youngquist, R. S. & Threlfall, W. R. St. Louis: Saunders Elsevier. (pp. 345-354).

European Commission. (2010) – Report of the meeting of bovine tuberculosis sub-group of the task force for monitoring animal disease eradication held in Idanha-a-Nova, Portugal. 26-27 April. 1-14. Acedido em 28/7/2014, em:

[http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/tb\\_report\\_portugal\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/tb_report_portugal_en.pdf)

Fino, T. (2011). Feridas nos membros dos equinos: É urgente ou pode esperar. Apresentado nas 3ª Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora. Évora.

García-Bocanegra, I., Pérez de Val, B., Arenas-Montes, A., Paniagua, J., Boadella, M., Gortázar, C., & Arenas, A. (2012). Seroprevalence and risk factors associated to *Mycobacterium bovis* in wild artiodactyl species from southern Spain, 2006-2010. *PLoS One*, 7(4) 1-8.

Garrido, J. M., Vicente, J., Carrasco-García, R., Galindo, R. C., Minguijón, E., Ballesteros, C., Aranaz, A., Romero, B., Sevilla, I., Juste, R., de la Fuente, J. & Gortázar, C. (2010). Experimental infection of Eurasian wild boar with *Mycobacterium avium subsp. avium*. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2), 240–5.

Gortázar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Gavín, P., Juste, R. A., Martín, C., Acevedo, P., de la Puente, M. & Höfle, U. (2005). Original article Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research*, 36, 43–52.

Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., & Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53(4), 241–256.

Gortázar, C., Delahay, R. J., McDonald, R. A., Boadella, M., Wilson, G. J., Gavier-Widen, D., & Acevedo, P. (2012). The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Review*, 42(3), 193–206.

Gowtage-Sequeira, S., Paterson, A., Lyashchenko, K. P., Lesellier, S., & Chambers, M. A. (2009). Evaluation of the CervidTB STAT-PAK for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in wild deer in Great Britain. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 16(10), 1449–52.

House, K. J. & Gunn, A. A. (2008). Manifestations and Management of Disease in Neonatal Ruminants. In. *Large Animal Internal Medicine*. (4<sup>th</sup> ed.). Smith, B. P. St. Louis: Mosby Elsevier. (pp. 293-332).

Jones, S. L. & Smith, B. P. (2008). Diseases of the Alimentary Tract. In. *Large Animal Internal Medicine*. (4<sup>th</sup> ed.). Smith, B. P. St. Louis: Mosby Elsevier. (pp. 667-892).

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J. (1997). Simultaneous

detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 907–14.

Landis, J. R. & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 31(1), 159-74.

Lisle, G. W. De, Bengis, R. G., Schmitt, S. M., & Brien, D. J. O. (2002). Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection in wildlife Ante-mortem diagnosis. *Revue Scientifique et Technique De L'Office International Des Epizooties*, 21(2), 317–334.

Maclachlan, J. & Dubovi, E. J. (2011). Antiviral Immunity and Prophylaxis. In *Fenner's Veterinary Virology* (4<sup>th</sup> ed.). Maclachlan, J., Dubovi, E. J. Academic Press: London (pp. 75-99).

Madeira, S., Ribeiro, R., Caetano, P., Fonseca, A. P., Manteigas, A., Caiola, L. & Boinas, F. (2014). Avaliação epidemiológica da infeção por *M. bovis* em Veados e Javalis na Região Centro de Portugal, entre 2011 e 2013. Apresentado no VI Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. Lisboa.

Maggs, D. J. (2008). Diseases of the Eye. In *Large Animal Internal Medicine*. (4<sup>th</sup> ed.). Smith, B. P. St. Louis: Mosby Elsevier. (pp. 1259-1305).

Martínez-López, B., Barasona, J. A., Gortázar, C., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Vicente, J. (2013). Farm-level risk factors for the occurrence, new infection or persistence of tuberculosis in cattle herds from South-Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 1–11.

Martín-Hernando, M. P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J. M., de la Fuente, J. & Gortazar, C. (2007). Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis complex* infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87(4), 360–7.

Martín-Hernando, M. P., Torres, M. J., Aznar, J., Negro, J. J., Gandía, a, & Gortázar, C. (2010). Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 43–50.

Mendoza, J., Parra, a, Tato, a, Alonso, J. M., Rey, J. M., Peña, J., García-Sanchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P. & Mendoza, M. (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Preventive Veterinary Medicine*, 74(2-3), 239–47.

Muñoz-Mendoza, M., Marreros, N., Boadella, M., Gortázar, C., Menéndez, S., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Copano, M. F., Amado, J., Sáez, J. L., Mourelo, J., & Balseiro, A. (2013). Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: a different picture from Mediterranean habitats. *BMC Veterinary Research*. 176(9), 1-11.

Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., & de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Veterinary Microbiology*, 127(1-2), 1–9.

Noakes, D. E (2009a). The approach to an obstetric case. In *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (9<sup>th</sup> ed.). Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. W. London: Saunders Elsevier. (pp. 223-231).

Noakes, D. E (2009b). General considerations. In *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (9<sup>th</sup> ed.). Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. W. London: Saunders Elsevier. (pp. 209-222).

Noakes, D. E (2009c). Postparturient prolapse of the uterus. In *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (9<sup>th</sup> ed.). Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. W. London: Saunders Elsevier. (pp. 319-325).

Parra, A., García, A., Inglis, N., Tato, A., Alonso, J. M., Mendoza, M., Mendoza, J. & Larrasa, J. (2006). An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Research in Veterinary Science*, 80(2), 140–6.

Portaria nº 178/2007 de 9 de fevereiro. *Diário da República nº 29/2007 – I Série*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. Acedido em 12/6/2014, em:

<http://www.dre.pt/pdf1s/2007/02/02900/10311036.pdf>

Quintas, H., Cordeiro, A. & Aguiar, C. (2014). Plantas que afetam a Reprodução. Em *Plantas Tóxicas para Ruminantes*. (1<sup>a</sup> ed.). Quintas, H., Cordeiro, A. & Aguiar, C. Publicações Ciência e Vida: Lisboa (pp. 67-70).

Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007a). Diseases of the newborn. In *Veterinary medicine: A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10<sup>th</sup> ed.). Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. London: Saunders Elsevier. (pp.127-172).

Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007b). Diseases of the alimentary tract - I. In *Veterinary medicine: A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10<sup>th</sup> ed.). Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. London: Saunders Elsevier. (pp.189-291).

Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007c). Diseases associated with bacteria - V. In *Veterinary medicine: A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10<sup>th</sup> ed.). Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. London: Saunders Elsevier. (pp.1061-1155).

Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007d). Diseases associated with bacteria - IV. In *Veterinary medicine: A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10<sup>th</sup> ed.). Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. London: Saunders Elsevier. (pp.1007-1060).

Regulamento nº 853/2004 de 29 de abril. *Jornal Oficial da União Europeia L139/55*. Comissão Europeia. Bruxelas. Acedido em 18/6/2014, em:

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:PT:PDF>

Rodríguez, E., Sánchez, L. P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M. S., Samper, S., & Iglesias, M. J. (2009). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(12), 1536–41.

Rohonczy, E. B., Balachandran, A. V., Dukes, T. W., Payeur, J. B., Rhyan, J. C., Saari, D. A., Whiting, T. L., Wilson, S. H. & Jarnagin, J. L. (1996). A comparison of gross pathology, histopathology, and mycobacterial culture for the diagnosis of tuberculosis in elk (*Cervus elaphus*). *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 60(2), 108–14.

Romão, R., Cargaleiro, K., Martelo, R., Paralta, D., Carolino, N. & Bettencourt, E. (2012). Resultados de exames andrológicos em touros de aptidão creatopoiética no sul de Portugal. Apresentado no *VIII Congresso Ibérico sobre recursos genéticos animais*. Évora.

Rush, B. & Mair, T. (2004a). Pneumonia in Adult Horses. In *Equine Respiratory Diseases*. (1<sup>st</sup> ed.). Rush, B. & Mair, T. Oxford: Blackwell Science. (pp. 271-290).

Rush, B. & Mair, T. (2004b). Noninfectious Pulmonary Diseases. In *Equine Respiratory Diseases*. (1<sup>st</sup> ed.). Rush, B. & Mair, T. Oxford: Blackwell Science. (pp. 189-229).

Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Källenius, G., Svenson, S. B., & Almeida, V. (2009). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(4), 1048–61.

Santos, N., Geraldes, M., Afonso, A., Almeida, V., & Correia-Neves, M. (2010). Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PloS One*, 5(9).

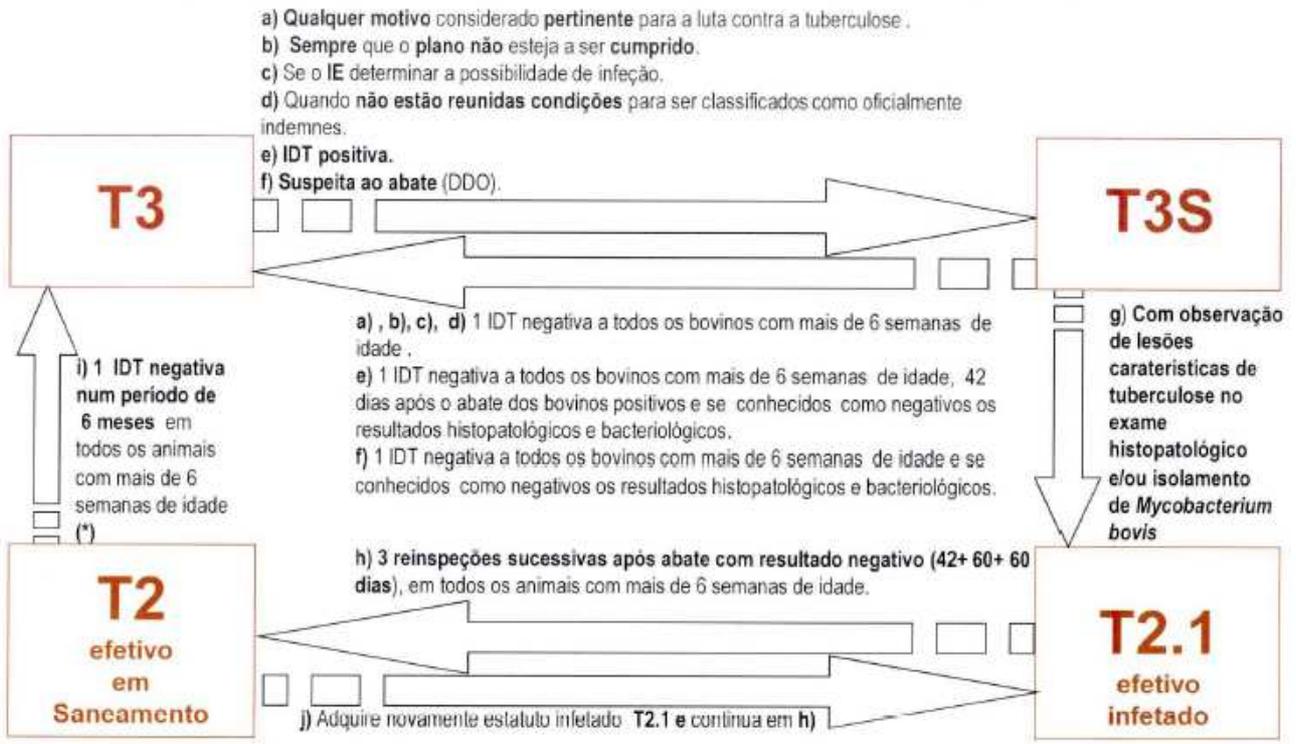
Santos, N., Correia-neves, M., Almeida, V., & Gortázar, C. (2012). Wildlife Tuberculosis : A Systematic Review of the Epidemiology in Iberian Peninsula. *Epidemiology Insights*, 273–94.

Skoric, M., Shitaye, E. J., Halouzka, R., Fictum, P., Trcka, I., Heroldova, M., Tkadlec, E. & Pavlik, I. (2007). Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals : a review. *Veterinarni Medicina*, 4, 144–161.

Skuce, R. a, Allen, A. R., & McDowell, S. W. J. (2012). Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. *Veterinary Medicine International*, 1–10.

- Stilwell, G. (2013). As doenças mais importantes dos bovinos. Em *Clínica de Bovinos*. (1ª ed.). Stilwell, G. Publicações Ciência e Vida: Lisboa (pp. 49-275).
- Valberg, S. J. (2008). Diseases of Muscles. In. *Large Animal Internal Medicine*. (4<sup>th</sup> ed.). Smith, B. P. St. Louis: Mosby Elsevier. (pp. 1388-1418).
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., & Gortazar, C. (2006). Original article Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Microbiology*, 37, 1–11.
- Vieira-Pinto, M., Alberto, J., Aranha, J., Serejo, J., Canto, A., Cunha, M. V., & Botelho, A. (2011). Combined evaluation of bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Central-East Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 57(6), 1189–1201.
- Waters, W. R., Palmer, M. V, Thacker, T. C., Davis, W. C., Sreevatsan, S., Coussens, P., Meade, K. G., Hope, J. C. & Estes, D. M. (2011). Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clinical & Developmental Immunology*, 1–11.
- Wilkins, P. A. & Woolums, A. R. (2008). Diseases of the Respiratory System. In. *Large Animal Internal Medicine*. (4<sup>th</sup> ed.). Smith, B. P. St. Louis: Mosby Elsevier. (pp. 490-666).
- Zanella, G., Duvauchelle, A., Hars, J., Moutou, F., Boschioli, M. L., & Durand, B. (2008). Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Veterinary Record*, 163, 43–47.
- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., & Pinna Parpaglia, M. L. (2008). Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmiasis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), 301–308.

## Anexo 1 – Fluxograma dos estatutos sanitários para a tuberculose bovina



(\*) Se obtidos resultados positivos na IDT realizada em i) procede-se ao abate dos bovinos positivos **com** recolha de amostras e efetua-se nova IDT aos 42 dias; Após esta IDT:  
 - **prossegue em i)** se conhecidos como negativos os resultados histopatológicos e bacteriológicos .  
 - se observadas lesões caraterísticas de tuberculose no exame histopatológico e/ou isolamento de *Mycobacterium bovis* **prossegue em j)**