



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CLÍNICA E CIRURGIA DE BOVINOS DE APTIDÃO LEITEIRA

*CARACTERIZAÇÃO DA INFEÇÃO POR BVDV E BoHV-1 EM EXPLORAÇÕES
LEITEIRAS DA ILHA DE SÃO MIGUEL, AÇORES*

Bruno Rafael Jorge da Costa

Orientação | Professor Doutor Ricardo Jorge da Costa
Trindade Palmeiro Romão

Orientação externa | Dr.^a Joana Cristina Pereira Andrade

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CLÍNICA E CIRURGIA DE BOVINOS DE APTIDÃO LEITEIRA

*CARACTERIZAÇÃO DA INFEÇÃO POR BVDV E BoHV-1 EM EXPLORAÇÕES
LEITEIRAS DA ILHA DE SÃO MIGUEL, AÇORES*

Bruno Rafael Jorge da Costa

Orientação | Professor Doutor Ricardo Jorge da Costa
Trindade Palmeiro Romão

Orientação externa | Dr.^a Joana Cristina Pereira Andrade

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2018

Agradecimentos

Ao professor Ricardo Romão, por ter aceite ser meu orientador, por todo o apoio e disponibilidade que teve para comigo durante a realização do estágio e deste trabalho, bem como ao longo dos cinco anos do curso.

À Professora Elisa Bettencourt, por tudo o que me ensinou e por toda a disponibilidade no decorrer do curso.

À Dra. Joana Andrade, minha orientadora externa, que tão bem me recebeu em São Miguel e na Associação de Jovens, por toda a ajuda, pelo que me ensinou e pelas aventuras que me proporcionou.

À Dra. Diana Pacheco, por todos os bons momentos passados durante o estágio, pela exigência e vontade de ensinar tão implícita na rotina do dia-a-dia, pela boa disposição e acima de tudo por marcar a diferença nesta etapa.

À restante equipa da Associação de Jovens Agricultores Micaelenses, por tão bem me receberem na vossa casa, em especial à Dra. Helena Gonçalves.

Ao Dr. João Camejo, pelo estágio que me proporcionou, pelos conhecimentos que me transmitiu, pelo respeito e pela amizade que sempre demonstrou.

Aos meus pais e irmã, por todos os valores que me inculcaram, por todas as oportunidades que me conseguiram criar e por colocarem sempre a minha felicidade em primeiro lugar!

Ao restante da minha família, em particular à avó São e tia Diana, à madrinha Olinda e tio Hernâni, pelo exemplo, carinho e apoio constante.

À Sandra, por ser quem é, por estar sempre lá. Por tudo.

Ao Manel e à minha Maria, por serem dos melhores amigos que a universidade me poderia ter dado!

À malta da minha vida académica: Uvinha, Patachona, Sancho, Crispim, Tali, Maria Inês, Phelps, Barradas, Armando e tantos outros companheiros, obrigado por manterem sempre o copo meio cheio, em todos os sentidos!

Ao Pedro, pelos cinco excelentes anos em que fomos colegas de casa.

A todos, o meu Obrigado!

Resumo

O presente relatório de estágio refere-se às atividades desenvolvidas e casos clínicos acompanhados durante o estágio curricular para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora, que decorreu na Associação dos Jovens Agricultores Micaelenses – Cooperativa Juventude Agrícola, ilha de São Miguel, Açores.

Foi realizado um estudo de caso com o tema “Caracterização da infeção por BVDV e BoHV-1 em explorações leiteiras da ilha de São Miguel, Açores” que permitiu compreender a dinâmica de circulação dos vírus, relacionar com as manifestações clínicas mais frequentes das explorações e definir estratégias para o controlo dos agentes. A utilização dos resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para os agentes virais referidos, em conjunto com informação recolhida pelo acompanhamento reprodutivo e clínico das explorações permitiu estabelecer a relação entre os vírus, práticas de manejo, infeção respiratória e afeções reprodutivas, reflexo da necessidade do controlo dos agentes.

Palavras-chave: BVDV, BoHV-1, doença respiratória bovina, infeção viral, bovinos de aptidão leiteira

Dairy Cattle Clinics and Surgery

Characterization of BVDV and BoHV-1 infection in dairy farms of São Miguel island, Azores

Abstract

The present report refers to the followed clinical cases and developed activities throughout the period of the internship at the *Associação de Jovens Agricultores Micaelenses – Cooperativa Juventude Agrícola*, island of S. Miguel, Azores, Portugal, for the conclusion of the Master's Degree in Veterinary Medicine from the University of Évora.

An experimental work regarding the Characterization of BVDV and BoHV-1 Infection in dairy farms of São Miguel island, Azores was pursued. It led to a better understanding of viral circulation dynamics and made clearer its relation to the most frequent clinical manifestations present in the farms and helped defining control strategies. The use of serum antibody testing results obtained, along with information gathered throughout clinical and reproductive veterinary assistance of the farms involved, made it possible to establish connections between viruses, management practice, respiratory infection and reproductive affections as reflections of the need to control agents.

Keywords: BVDV, BoHV-1, bovine respiratory disease, viral infection, dairy cattle

Índice geral

1. INTRODUÇÃO	1
2. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	2
2.1. Local de estágio	2
2.2. Casuística	3
2.2.1. Profilaxia e medicina preventiva	4
2.2.2. Clínica médica	6
2.2.2.1. Sistema respiratório	6
2.2.2.2. Sistema digestivo	10
2.2.2.3. Sistema reprodutor	12
2.2.2.4. Glândula mamária	14
2.2.2.5. Desequilíbrios metabólicos	18
2.2.2.6. Sistema musculoesquelético	20
2.2.2.7. Pele e anexos	22
2.2.2.8. Outros casos	24
2.2.3. Clínica cirúrgica	25
2.2.4. Controlo reprodutivo	28
2.2.5. Provas laboratoriais	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE DOENÇA RESPIRATÓRIA BOVINA, DIARREIA VIRAL BOVINA E RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA	31
3.1. Introdução	31
3.2. Doença Respiratória Bovina	31
3.2.1. Fatores ambientais	32
3.2.2. Fatores do hospedeiro	32
3.2.3. Agentes etiológicos virais	33
3.2.3.1. Vírus respiratório sincicial bovino	34
3.2.3.2. Vírus da parainfluenza tipo 3	36
3.3. Diarreia viral bovina	37
3.3.1. Etiologia	37
3.3.2. Epidemiologia e transmissão	38
3.3.3. Patogenia	39

3.3.3.1. Animais persistentemente infetados (PI)	39
3.3.4. Manifestação clínica	41
3.3.4.1. Infeção subclínica	42
3.3.4.2. Infeção aguda	42
3.3.4.3. Síndrome hemorrágica	43
3.3.4.4. Doença das mucosas	43
3.3.4.5. Manifestações reprodutivas	43
3.3.5. Diagnóstico	44
3.3.6. Controlo e erradicação	44
3.4. Rinotraqueíte infecciosa bovina	46
3.4.1. Etiologia	46
3.4.2. Epidemiologia e transmissão	48
3.4.3. Patogenia	49
3.4.4. Manifestação clínica	50
3.4.5. Diagnóstico	51
3.4.6. Controlo e erradicação	53
3.5. Impacto económico da doença respiratória bovina	54
3.6. Estratégias de controlo e monitorização da doença respiratória bovina	55
4. ESTUDO DE CASO: CARACTERIZAÇÃO DA INFEÇÃO POR BVDV E BOHV-1 EM EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA DE SÃO MIGUEL, AÇORES.	57
4.1. Introdução	57
4.2. Material e métodos	57
4.2.1. Explorações	57
4.2.3. Inquérito epidemiológico	60
4.2.4. Serologia	60
4.2.5. Análise estatística	61
4.3. Resultados	61
4.3.1. Inquérito epidemiológico	61
4.3.2. Estudo de prevalências e resultados serológicos	62
4.3.2.1. Pi-3	63
4.3.2.2. BRSV	64
4.3.2.3. BVDV	66

4.3.2.4. BoHV-1 _____	67
4.3.3. Contributo dos fatores de manejo da exploração na prevalência dos agentes virais BVDV e BoHV-1 _____	69
4.3.4. Efeito da seroprevalência dos vírus BVDV e BoHV-1 na infecção respiratória e afeções reprodutivas presentes nas explorações _____	70
4.4. Discussão _____	72
4.5. Conclusão _____	79
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	82
ANEXO I: INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO _____	96

Índice de figuras

Figura 1: Efetivo bovino em parque de alimentação. _____	5
Figura 2: Corrimento nasal (A) e corrimento ocular (B) em vitelos com diagnóstico de pneumonia. _____	8
Figura 3: Placenta retirada de vaca com retenção das membranas fetais e consequente metrite puerperal. _____	13
Figura 4: Realização do TCM. Antes (A) e depois (B) da aplicação do reagente Teepol. _____	15
Figura 5: Vaca em decúbito devido a hipocalcemia clínica. _____	19
Figura 6: Fibropapilomas cutâneos na face interna do membro posterior direito de uma novilha. _____	22
Figura 7: Lesões cutâneas de fotossensibilidade secundária em fase de resolução. _____	23
Figura 8: Etapas da resolução cirúrgica de DAE. Preparação do campo cirúrgico (A), acesso à cavidade abdominal e identificação do abomaso (B), sutura do abomaso (C), fixação do abomaso na posição anátomo-fisiológica (D), encerramento da segunda camada muscular (E) e sutura da pele (F). _____	27
Figura 9: Representação esquemática dos fatores associados ao estabelecimento da doença respiratória bovina. _____	31
Figura 10: Feto abortado por novilha com serologia positiva para a pesquisa de anticorpos para BVDV e serologia negativa para Neospora caninum. _____	40
Figura 11: Representação esquemática das repercussões para o vitelo pela infecção por BVDV durante a gestação (Peterhans et al., 2013). _____	40
Figura 12: Mapa da ilha de São Miguel e distribuição geográfica das explorações inseridas no trabalho experimental. _____	58

Índice de gráficos

Gráfico 1: Distribuição da casuística observada por áreas de intervenção. Valores de frequência absoluta e frequência relativa (n=1947).	3
Gráfico 2: <i>Distribuição da casuística de clínica médica pelos diferentes sistemas (n=650) e respectivos valores de Fr.</i>	6
Gráfico 3: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos do vírus Pi-3 em vacas, por exploração (n=128) e respectivos valores de Fr.	63
Gráfico 4: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos do vírus Pi-3 em novilhas, por exploração (n=106) e respectivos valores de Fr.	64
Gráfico 5: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para o BRSV em vacas, por exploração (n=128) e respectivos valores de Fr.	65
Gráfico 6: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para o BRSV em novilhas, por exploração (n=106).	65
Gráfico 7: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para a proteína p80 do BVDV em vacas, por exploração (n=128) e respectivos valores de Fr.	66
Gráfico 8: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para a proteína p80 do BVDV em novilhas, por exploração (n=106) e respectivos valores de Fr.	67
Gráfico 9: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos totais para BoHV-1 em vacas, por exploração (n=128) e respectivos valores de Fr.	68
Gráfico 10: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos totais para BoHV-1 em novilhas, por exploração (n=106) e respectivos valores de Fr.	68
Gráfico 11: Frequências relativas dos resultados serológicos positivos dos lotes de vacas para todos os vírus, de cada exploração.	69
Gráfico 12: Frequências relativas dos resultados serológicos positivos dos lotes de novilhas para todos os vírus, de cada exploração.	69

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição das intervenções de profilaxia e medicina preventiva (n=870).	4
Tabela 2: Distribuição dos casos clínicos do sistema respiratório (n=166).	7
Tabela 3: Distribuição dos casos clínicos associados ao sistema digestivo (n=136).	10
Tabela 4: Distribuição dos casos clínicos do sistema reprodutor (n=109).	12
Tabela 5: Distribuição de casos clínicos referentes a afeções da glândula mamária (n=72).	14
Tabela 6: Distribuição de casos clínicos referentes a distúrbios metabólicos (n=69).	18
Tabela 7: Distribuição dos casos clínicos do sistema musculoesquelético (n=39).	21
Tabela 8: Distribuição de casos clínicos da pele e anexos (n=34).	22
Tabela 9: Distribuição de casos clínicos classificados como outros casos (n=25).	24
Tabela 10: Distribuição dos casos clínicos de patologia cirúrgica (n=21).	25
Tabela 11: Distribuição da casuística observada no controlo reprodutivo às explorações (n=332).	28
Tabela 12: Distribuição de provas laboratoriais realizadas (n=74).	29
Tabela 13: Localidades das explorações pecuárias.	58
Tabela 14: Dados relativos ao número de animais por exploração, animais em lactação e respetivos números de amostras colhidas e distribuição da amostra, por exploração.	59
Tabela 15: Distribuição da amostra, por exploração (n=234).	59
Tabela 16: Explorações em que existe o hábito de adquirir animais para o efetivo e explorações em que há recurso à cobertura natural.	61
Tabela 17: Afeções consideradas frequentes em cada exploração.	62
Tabela 18: Prevalência de animais seropositivos na amostra (n=234).	62
Tabela 19: Prevalência de animais seropositivos em função do grupo etário em que se inserem: vacas (n=128) ou novilhas (n=106).	62
Tabela 20: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus Pi-3.	63
Tabela 21: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus BRSV.	64
Tabela 22: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus BVDV.	66
Tabela 23: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus BoHV-1.	67
Tabela 24: Efeito da aquisição de animais na prevalência de animais com serologia positiva para BVDV e BoHV-1 (n=234).	70
Tabela 25: Efeito da cobertura natural na prevalência de animais com serologia positiva para BVDV e BoHV-1 (n=234).	70
Tabela 26: Efeito da seropositividade para BVDV e BoHV-1 na frequência de infeção respiratória (n=234).	70
Tabela 27: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de retenção de membranas fetais (n=128).	71
Tabela 28: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de metrite das explorações (n=128).	71

Tabela 29: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de animais repeat breeders das explorações (n=128). _____ 71

Tabela 30: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de morte embrionária e aborto das explorações (n=128). _____ 72

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AJAM-CJA – Associação dos Jovens Agricultores Micaelenses – Cooperativa Juventude Agrícola

ANOVA – Análise de variância (Analysis of variance)

BoHV-1 – Herpesvírus Bovino tipo 1 (Bovine Herpesvirus type 1)

BVD – Diarreia Viral Bovina (Bovine Viral Diarrhoea)

BVDV – Vírus da Diarreia Viral Bovina (Bovine Viral Diarrhoea Virus)

BRSV – Vírus Respiratório Sincicial Bovino (Bovine Respiratory Syncytial Virus)

CCS – Contagem de Células Somáticas

CRB – Complexo Respiratório Bovino

DAE – Deslocamento de abomaso à esquerda

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DRB – Doença Respiratória Bovina

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Fa – Frequência absoluta

Fr – Frequência relativa

gB, gC, gE, gN – Glicoproteínas B, C E e N

H₀ – Hipótese nula

IBP – Balanopostite Infeciosa (Infectious Balanoposthitis)

IBR – Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (Infectious Bovine Rhinotracheitis)

IL - Interleucina

INF – Interferão

IPV – Vulvovaginite Postular Infeciosa (Infectious Pustular Vulvovaginitis)

LPS - Lipopolissacáridos

LR-RNA – Gene relacionado com a latência (*Latency-related gene*)

MAP – *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MD – Doença das Mucosas (*Mucosal Disease*)

MHC-I – Complexo Maior de Histocompatibilidade classe I (*Major Histocompatibility Complex class I*)

MHC-II – Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II (*Major Histocompatibility Complex class II*)

ORF – Fases de leitura aberta (*Open Reading Frame*)

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

Pi-3 – Vírus da Parainfluenza tipo 3 (Parainfluenza type 3 virus)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PTH – Paratormona

RMF – Retenção de Membranas Fetais

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RTq-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (*real time Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*)

TAP - *Transporter-associated with Antigen Presentation*

TCM – Teste Californiano de Mastites

TLR – *Toll-like Receptors*

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

U_L – *Unique Long*

U_S – *Unique Short*

1. Introdução

O presente relatório de estágio tem como objetivo descrever a casuística e as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, que decorreu entre o dia 16 de outubro de 2017 e o dia 19 de abril de 2018, tendo a duração de seis meses. Foi realizado na Associação dos Jovens Agricultores Micaelenses – Cooperativa Juventude Agrícola (AJAM-CJA), com sede na Ilha de São Miguel, arquipélago dos Açores, sob a orientação do Doutor Ricardo Romão e coorientação da Dr.^a Joana Andrade.

Com o intuito de adquirir competências na área da clínica e cirurgia de bovinos, o estágio regeu-se pelo acompanhamento da equipa médico-veterinária no serviço ambulatório de clínica e, como complemento, no serviço de assistência reprodutiva às explorações associadas.

A segunda parte deste trabalho centra-se na temática dos agentes virais da doença respiratória bovina, com maior ênfase no vírus da diarreia viral bovina e vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina. Após revisão bibliográfica sobre estes agentes, segue-se o estudo de caso: **Caracterização da infeção por BVDV e BoHV-1 em explorações leiteiras da ilha de São Miguel, Açores.**

Além da doença respiratória, ambos os vírus têm tropismo para o sistema reprodutor. Neste trabalho procura-se relacionar os resultados serológicos de amostras de sangue recolhidas a grupos de vacas e novilhas de 13 explorações com um conjunto de variáveis associadas ao manejo e com as principais doenças reprodutivas que afetam as explorações às quais pertencem.

2. Relatório de estágio

2.1. Local de estágio

A Associação dos Jovens Agricultores Micaelenses – Cooperativa Juventude Agrícola (AJAM-CJA) foi fundada em 1986 com o intuito de representar os jovens agricultores da região, assim como os seus interesses junto de entidades nacionais e internacionais, promover a partilha de conhecimento e informação junto dos seus associados e prestar um conjunto de serviços de consultadoria e apoio à agricultura.

Esta associação disponibiliza a todos os seus sócios o serviço médico-veterinário de clínica, cirurgia e assistência reprodutiva. Atualmente, a equipa médico-veterinária é constituída por dois elementos dedicados ao saneamento anual, cinco médicos veterinários na área da clínica e cirurgia de bovinos de aptidão leiteira e um médico veterinário responsável pelo acompanhamento reprodutivo dos efetivos leiteiros. Uma equipa de sete técnicos encarrega-se pelo serviço de inseminação artificial e podologia bovina.

As instalações da AJAM-CJA estão situadas no Centro de Bovinicultura das Arribanas, freguesia de Arrifes, concelho de Ponta Delgada, ilha de São Miguel. Dispõem de um centro de armazenamento de sémen, farmácia e armazém, laboratório e escritórios para os serviços de consultadoria e contabilidade. Também dispõe de uma vacaria, com um efetivo leiteiro de aproximadamente 80 vacas em lactação, instalações de recria de vitelos e diversos terrenos de pastagem.

No segundo semestre de 2017, foram contabilizados 278 mil bovinos na Região Autónoma dos Açores, sendo que 190 mil destes animais são adultos, a maioria fêmeas de aptidão leiteira com idade superior a um ano.

O regime de exploração nos Açores é bastante diferente dos regimes de exploração que se observam no continente. A maioria dos efetivos bovinos concentra-se na pastagem ou tem acesso à mesma durante a maior parte do dia e noite, embora existam explorações que funcionam em sistema intensivo. A dimensão média das explorações nos Açores é menor, quando comparado com a dimensão das explorações do continente.

Os sistemas de ordenha são diversificados existindo salas de ordenha em explorações intensivas ou semi-intensivas e sistemas de ordenha móveis, frequentes em explorações permanentemente na pastagem. A alimentação dos animais é feita maioritariamente pelo pastoreio, sendo que a suplementação com silagem de milho e feno é frequente.

A cultura do milho, durante os meses de verão, permite o fabrico da silagem, utilizada nos períodos de relativa escassez alimentar e para suplemento na alimentação dos animais em produção.

O Setor Leiteiro é aquele que mais representa a agricultura da região. Posto isso, na ilha de São Miguel existem quatro fábricas de recolha e processamento de leite, que produzem leite para consumo humano e lacticínios, como queijos, manteiga e iogurtes e leite em pó.

2.2. Casuística

No decurso do estágio curricular, todos os diagnósticos e serviços prestados aos produtores foram registados com o intuito de elaborar um relatório que inclui a casuística das atividades desenvolvidas. Ao acompanhar o trabalho dos médicos veterinários que prestam o serviço de clínica e fazem o acompanhamento reprodutivo das explorações, foi possível cimentar conhecimentos fundamentais ao exercício da atividade.

A descrição da casuística observada durante o estágio encontra-se organizada pelas seguintes áreas de intervenção: patologia clínica; patologia cirúrgica; controlo reprodutivo; profilaxia e medicina preventiva; provas laboratoriais. Por sua vez, a patologia clínica de bovinos está organizada consoante os sistemas anatomofisiológicos em que se insere.

No gráfico 1 pode-se observar a distribuição da casuística observada nas respetivas áreas de intervenção. Num universo de 1873 bovinos intervencionados, a profilaxia e medicina preventiva assumem a maior frequência relativa (Fr) uma vez que inclui a vacinação de efetivos leiteiros. Porém, é de destacar a Fr da componente clínica médica, uma vez que é este o principal serviço prestado aos associados da AJAM-CJA pela equipa médico-veterinária.

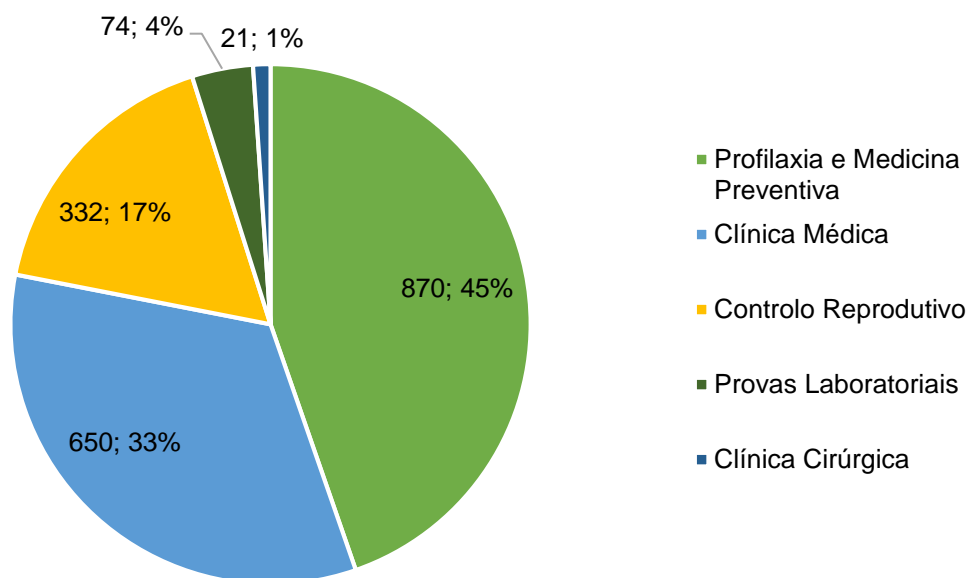


Gráfico 1: Distribuição da casuística observada por áreas de intervenção. Valores de frequência absoluta e frequência relativa (n=1947).

2.2.1. Profilaxia e medicina preventiva

A medicina preventiva assume um papel crescente na atividade do médico veterinário. A prevenção de doenças que afetam a produção e o bem-estar animal é uma das principais ferramentas dos produtores para manterem os níveis de produção, reduzir a taxa de refugo do efetivo e as despesas em tratamentos veterinários.

As responsabilidades do médico veterinário focam-se na saúde animal e, por conseguinte, na saúde humana, uma vez que o potencial zoonótico de diversos agentes patogénicos deve ser avaliado, e devem ser tomadas todas as medidas necessárias para bloquear a entrada desses mesmos agentes na cadeia alimentar humana.

Um conjunto de atos médico-veterinários é realizado ao abrigo dos planos nacionais e regionais de controlo e erradicação de doenças como a tuberculose, brucelose e as encefalopatias espongiformes transmissíveis dos bovinos. Com a exceção da colheita de tronco encefálico, todos os outros procedimentos são da responsabilidade de equipas médico-veterinárias distintas da equipa responsável pela clínica e cirurgia de bovinos.

Tabela 1: Distribuição das intervenções de profilaxia e medicina preventiva (n=870).

Profilaxia e Medicina Preventiva	Fa (n)	Fr (%)
Vacinação	603	69,3%
Desparasitação	96	11,0%
Colheita de sangue para serologia	83	9,5%
Aplicação de bolus ruminais	57	6,6%
Colheita de tronco encefálico	20	2,3%
Administração de Inmodulen® a vitelos	11	1,3%
Total	870	100%

Na tabela 1 registam-se os procedimentos de profilaxia e medicina preventiva registados no decorrer do estágio, em frequência absoluta (Fa) e Fr. Foram vacinados 79 animais com a vacina Startvac® e 524 animais com a vacina Hiprabovis® 4. A vacinação com Startvac® confere proteção polivalente para agentes ambientais da mastite bovina pelo que é constituída por estirpes inativadas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Com a necessidade de reduzir a utilização de antimicrobianos na produção animal, o controlo das mastites contagiosas e ambientais torna-se imperativo, quer através de melhorias a nível do manejo, higiene e cuidados antes, durante e depois da ordenha, quer pelo reforço da resposta imunitária dos animais face aos agentes ambientais (Klaas & Zadoks, 2017).

A vacina Hiprabovis® 4 tem valência para os agentes virais da doença respiratória bovina (DRB): vírus da diarreia viral bovina (Bovine Viral Diarrhoea Virus - BVDV), vírus rinotraqueíte infecciosa bovina (Infectious Bovine Rhinotracheitis - IBR), vírus da parainfluenza tipo 3

(Parainfluenza type 3 virus - PI-3) e vírus respiratório sincicial bovino (Bovine Respiratory Syncytial Virus - BRSV).

O protocolo vacinal instaurado nas explorações que vacinaram para estes vírus consistiu numa primo-vacinação com reforço passadas três semanas e revacinação semestral. Na figura 1 observa-se um efetivo após a vacinação semestral para os agentes da DRB. Sempre que possível, recorre-se às instalações e equipamentos das explorações para realizar a contenção para atos médico-veterinários, como a vacinação. Em explorações onde se registam múltiplos casos de doença respiratória é importante estabelecer a revacinação a cada seis meses. Quando há controlo da infeção, avaliado pela menor incidência de animais doentes e pela diminuição da severidade dos sinais clínicos, pode-se ponderar o esquema de revacinação anual.



Figura 1: Efetivo bovino em parque de alimentação.

A utilização do Inmodulen® em vitelos tem como objetivo diminuir a incidência de diarreia neonatal, pela melhoria da resposta do organismo face à presença dos agentes patogénicos. Constituído por lipopolissacáridos (LPS) de *E. coli* e células inativadas de *Propionibacterium granulosum*, que promovem o estímulo dos linfócitos B e macrófagos. As diarreias neonatais provocadas por *E. coli* surgem nos primeiros dias de vida, pelo que a administração de Inmodulen® foi realizada ao primeiro e terceiro dia de vida dos vitelos.

A colheita de tronco encefálico é um procedimento obrigatório, ao abrigo do plano de vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. O tronco cerebral deve ser recolhido a todos os animais com morte na exploração, que tenham mais de quatro anos de idade e cujo destino seja o enterramento na própria exploração.

2.2.2. Clínica médica

Os 650 casos clínicos estão agrupados em sete sistemas anatomofisiológicos, sendo eles o sistema respiratório, sistema digestivo, sistema reprodutor, sistema musculoesquelético, glândula mamária, desequilíbrios metabólicos, pele e anexos. Vinte e cinco casos clínicos agruparam-se em outros casos, como representa o gráfico 2.

Na descrição da casuística serão abordados os casos clínicos que registaram maior frequência ou os casos clínicos com particular interesse devido ao facto da sua prevalência ser crescente ou estarem associados aos sistemas de produção e condições ambientais dos Açores.

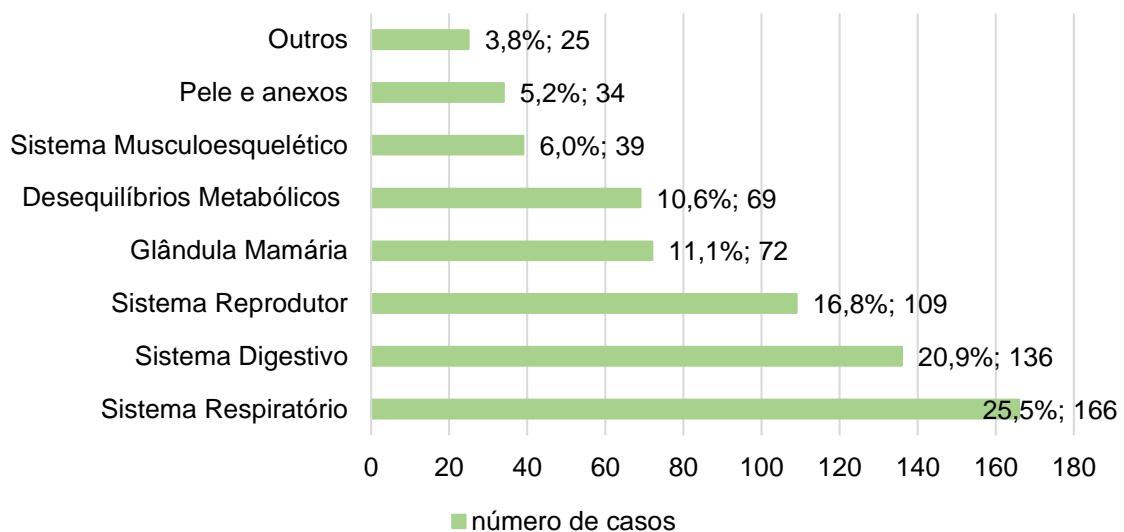


Gráfico 2: Distribuição da casuística de clínica médica pelos diferentes sistemas (n=650) e respetivos valores de Fr.

Analisando o gráfico 2, verifica-se que os sistemas respiratório, digestivo e reprodutor assumem a maioria dos casos clínicos com 166, 136 e 109 casos descritos, respetivamente. As afeções da glândula mamária e os desequilíbrios metabólicos, com 72 e 69 casos clínicos, respetivamente, estão acima do sistema musculoesquelético e da categoria pele e anexos, em número absoluto. Com 25 casos clínicos descritos está a categoria outros, que engloba afeções oculares e meningite, por exemplo.

2.2.2.1. Sistema respiratório

O sistema respiratório, ainda que apresente o maior número de casos clínicos é o sistema com a menor variedade casuística, como se regista na tabela 2. Com frequências bastante similares, as pneumonias em animais adultos e vitelos constituem a totalidade das observações. Nos meses de inverno é espectável um maior número de casos de pneumonia,

uma vez que as oscilações de temperatura e a pluviosidade típica dos Açores levam à diminuição dos fatores de defesa do hospedeiro.

Tabela 2: Distribuição dos casos clínicos do sistema respiratório (n=166).

Sistema respiratório	Fa (n)	Fr (%)
Pneumonia em adultos	88	53,0%
Pneumonia em vitelos	78	47,0%
Total	166	100%

Existe um conjunto de denominações para a pneumonia nos bovinos. Além de “doença respiratória bovina (DRB)”, fala-se muitas vezes de febre dos transportes, caracterizada pela doença pulmonar despoletada pelo *stress*, bem como da pneumonia enzoótica dos vitelos, que ocorre até próximo dos cinco meses de vida. Todas estas doenças têm a mesma complexa e variada etiologia de agentes infecciosos e manifestam-se pelo sinergismo de diversos fatores, como o manejo, as condições ambientais e as particularidades anatomofisiológicas e imunitárias do hospedeiro (Earley *et al.*, 2017).

A DRB ou complexo respiratório bovino (CRB) será abordado em detalhe na revisão bibliográfica deste trabalho, com particular ênfase nos agentes etiológicos virais: BVDV, vírus da IBR ou herpesvírus bovino tipo 1 (Bovine Herpesvirus type 1 - BoHV-1), BRSV e Pi-3 (Potter, 2015). Os principais agentes etiológicos bacterianos da DRB são: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia hemolitica*, *Mycoplasma bovis* e *Histophilus somni* (Griffin *et al.*, 2010; Mosier, 2015).

Os agentes virais são responsáveis pela lesão da mucosa respiratória e pela supressão da resposta imunitária do hospedeiro, o que facilita a proliferação das bactérias e o estabelecimento dos quadros clínicos de pneumonia (Mosier, 2015). As bactérias, que são comensais ao trato respiratório, comportam-se como oportunistas da quebra de imunidade estabelecida pelos vírus, ainda que alguns destes agentes possam provocar doença de forma isolada. Para além de bactérias e vírus, nematodes pulmonares podem estar envolvidos na etiologia da doença (Griffin *et al.*, 2010).

A *Pasteurella multocida* é um agente comensal da nasofaringe e tem sido isolado como agente patogénico tanto em vitelos como em animais adultos. Esta bactéria apresenta diferentes serogrupos, sendo o serotipo A maioritariamente prevalente em bovinos (Mosier, 2015). Além de possuir fimbrias e adesinas, como a lipoproteína B, este agente reúne um conjunto de proteínas de superfície de membrana e toxinas do LPS que induzem a imunidade humoral e celular do hospedeiro. As leucotoxinas promovem a adesão e migração dos neutrófilos a nível das camadas celulares do endotélio. Nem todos os antigénios de *P. multocida* são conhecidos, nem o desempenho de cada um dos seus fatores de virulência na patogenia da DRB (Dabo *et al.*, 2008; Griffin *et al.*, 2010).

Também comensal do trato respiratório superior, a *Mannheimia hemolitica* tem no serotipo A1 o mais prevalente em bovinos. Esta bactéria tem vários fatores de virulência importantes para o estabelecimento da doença: adesinas que permitem a colonização do epitélio pulmonar, neuraminidase que reduz a viscosidade do surfactante pulmonar e a membrana de LPS. Esta membrana reúne um conjunto de toxinas que causam edema e hemorragia pulmonar, leucotoxinas que provocam a lise de leucócitos e plaquetas e fatores pró-inflamatórios. A leucotoxina liga-se ao CD18, recetor presente nos macrófagos e neutrófilos, pelo que é considerada o seu principal fator de virulência (Griffin *et al.*, 2010).

O *Mycoplasma bovis* tem um papel, na pneumonia dos vitelos, muito mais estudado que na DRB em animais adultos (Griffin *et al.*, 2010). Este agente patogénico é responsável por quadros de bacteriemia, com artrites ou tenossinovites como complicações, bem como otite média em vitelos. Sabe-se que produz biofilmes estáveis no início da infeção e a sequenciação genómica de amostras isoladas em infeções experimentais tem vindo a revelar múltiplos fatores de virulência (Calcutt *et al.*, 2018).

Por último, o *Histophilus somni*, também comensal do trato respiratório, coloniza maioritariamente a região inferior. Os seus fatores de virulência são similares aos de *M. hemolitica* e incluem proteínas de membrana, uma endotoxina, uma rede fibrilar que anula a ação da imunoglobulina G, produz histamina e um exopolissacárido. O microrganismo não consegue sobreviver em meio intracelular, mas as suas proteínas de membrana bloqueiam a fagocitose por parte de macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos e liberta toxinas que induzem a morte das células de defesa do hospedeiro. Provoca broncopneumonia fibrinosa e, quando entra em circulação, é responsável por quadros de meningoencefalite tromboembólica, poliartrite, pericardite fibrinosa e necrose do miocárdio, que resulta em morte súbita e aborto em animais gestantes (Corbeil, 2015; Griffin *et al.*, 2015). Os sinais clínicos observados são a letargia, anorexia, dispneia e taquipneia, taquicardia e febre (Buczinski *et al.*, 2014). Em vitelos podem surgir quadros de septicémia, com sinais clínicos neurológicos e a nível das articulações, que impossibilitam a estação (Corbeil, 2015). A figura 2 permite observar o corrimento nasal e ocular frequentemente encontrado em vitelos com diagnóstico de pneumonia.



Figura 2: Corrimento nasal (A) e corrimento ocular (B) em vitelos com diagnóstico de pneumonia.

O exame físico, incluindo a auscultação pulmonar, é fundamental para o estabelecimento do diagnóstico de pneumonia. Outros meios complementares de diagnóstico aplicados com o intuito de identificar os agentes etiológicos são: zangarato nasal, lavagens broncoalveolares e lavagem transtraqueal, métodos serológicos e, em caso de surtos e para caracterização da doença ao nível da exploração, a necropsia (Potter, 2015).

As infeções subclínicas, clínicas e crónicas conduzem a um conjunto de repercussões a nível económico, uma vez que a doença afeta o crescimento dos vitelos, a produção de leite, a *performance* reprodutiva e a longevidade dos animais (McGuirk, 2008).

O tratamento das infeções pulmonares engloba o uso de anti-inflamatórios para redução do edema e inflamação pulmonar, como o carprofeno (Rimadyl®) ou o ácido tolfenâmico (Tolfedine®), e o uso de antimicrobianos para combate aos agentes infecciosos. As resistências e os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos por parte dos agentes bacterianos diferem entre regiões, e inclusive, entre explorações. Macrólidos, β -Lactâmicos e fluoroquinolonas são grupos farmacológicos de princípios ativos frequentemente utilizados (McGuirk, 2008). Está recomendado o uso dos mesmos princípios ativos quando há boa resposta a um tratamento dentro da exploração (Potter, 2015).

Para além do tratamento com antimicrobianos e anti-inflamatórios, fez-se o tratamento de suporte para a desidratação, quando necessário. Recorreu-se à administração de mucolíticos, como o cloridrato de bromexina (Eres®), em animais que apresentavam dificuldade respiratória severa e ferveres à auscultação pulmonar.

Para controlo da incidência de pneumonia em vitelos deve-se promover o desenvolvimento de um sistema imunitário eficiente, pela administração de colostro de qualidade e conseqüente redução das falhas de transferência de imunidade passiva. Uma vez que as defesas imunitárias estão dependentes da ingestão de imunoglobulinas nas primeiras horas de vida, a avaliação e correta administração de colostro é fundamental para um controlo da doença respiratória. Em segundo lugar, a higiene e ventilação das instalações em que os vitelos estão alojados devem ser suficientes para reduzir a carga infecciosa ambiental de agentes patogénicos e de gases irritantes para a mucosa e epitélio. Ainda que o alojamento no exterior possa ser a melhor opção, deve-se considerar as variações de temperatura e outros aspetos meteorológicos (Gorden & Plummer, 2010).

Em bovinos adultos, a aplicação de protocolos vacinais para os agentes virais e alguns agentes bacterianos, permite uma redução na incidência de casos de pneumonia. Para que o protocolo vacinal manifeste resultados, outros aspetos devem ser tomados em consideração pelos produtores: a ventilação das instalações nos sistemas intensivos, a alimentação para manutenção do sistema imunitário, as situações de *stress* a que os animais são expostos, e as

medidas de biossegurança das explorações pecuárias, que desempenham um papel na dinâmica da doença respiratória bovina (Gorden & Plummer, 2010; Potter, 2015).

2.2.2.2. Sistema digestivo

Na tabela seguinte observa-se que a diarreia em vitelos constituiu a maioria dos casos clínicos relacionados com o sistema digestivo, tal como esperado. A diarreia em bovinos adultos, que representa 16,2% dos casos, está associada à manifestação clínica da paratuberculose, que se discutirá mais adiante. Na descrição de casos de clínica cirúrgica será abordado o deslocamento de abomaso à esquerda (DAE). Importa referir que nem todos os casos de deslocamento de abomaso à esquerda tiveram resolução cirúrgica, sendo aplicado o tratamento conservador.

Tabela 3: Distribuição dos casos clínicos associados ao sistema digestivo (n=136).

Sistema digestivo	Fa (n)	Fr (%)
Diarreia em vitelos	68	50,0%
Diarreia em bovinos adultos	22	16,2%
Deslocamento de abomaso à esquerda (DAE)	19	14,0%
Acidose	8	5,9%
Indigestão	5	3,6%
Suspeita de torção intestinal	4	2,9%
Suspeita de reticulo-peritonite traumática	3	2,2%
Timpanismo espumoso	2	1,5%
Timpanismo gasoso	2	1,5%
Dilatação de ceco	2	1,5%
Úlcera do abomaso	1	0,7%
Total	136	100%

A acidose e a indigestão, bem como o timpanismo, são afeções com maior frequência em animais de sistema intensivo, como as engordas de bovinos, em que a alimentação com alimentos concentrados e silagem assume um papel crucial no desenvolvimento dos quadros clínicos, sendo a sua Fr baixa nos sistemas de exploração leiteiros. Na ilha de São Miguel, o regime de exploração é maioritariamente extensivo, em que as vacas se alimentam na pastagem e os alimentos concentrados e silagem são um complemento para as necessidades energéticas dos animais em lactação, pelo que o número de casos observados é relativamente baixo.

A abordagem aos animais adultos que apresentavam diarreia como único sinal clínico, consistiu no tratamento sintomático e determinação da causa primária. O tratamento da acidose, com administração de 300ml de solução de bicarbonato de sódio a 8,4% por via endovenosa, associado a fluidoterapia por via endovenosa, suplementada com glucose a 30% e a fluidoterapia

por via oral, complementada com uma saqueta de reconstituintes da flora ruminal e eletrólitos foi o tratamento preconizado. Associou-se a administração de sulfadoxina-trimetoprim (Dofatrimject®) na dose 15mg/kg de peso vivo, durante três dias, por via intramuscular. Fez-se a administração de bicarbonato de sódio por mais três dias, por via oral, 100g por dia. Administrou-se também metamizol (Vetalgin®), uma vez que tem ação antiespasmódica e analgésica, na dose de 40mg por Kg de peso vivo, por via endovenosa.

No exame físico, a avaliação da condição corporal, a idade do animal e a quebra na produção de leite, permitem estabelecer o diagnóstico diferencial de paratuberculose. A presença de sons metálicos (pings) à auscultação percussão combinadas é espectável, uma vez que o intestino está repleto de gás e líquido. No momento em que se instaurou o tratamento, foi recolhida uma amostra de sangue para pesquisa de anticorpos pelo ensaio de Imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA), no Laboratório Regional de Veterinária, pelo que todos os animais testados obtiveram serologia positiva - 16 dos 22 casos de diarreia observados.

O *Mycobacterium avium spp paratuberculosis* (MAP) é o agente da paratuberculose bovina. Esta bactéria, um bacilo gram positivo, álcool-ácido-resistente e intracelular facultativo, é capaz de estabelecer longos períodos de incubação, que vão dos dois aos dez anos. Após infecção, o crescimento do microrganismo ocorre de forma lenta na mucosa intestinal, até atingir os linfonodos regionais, onde estabelece a infecção latente nos macrófagos (Fecteau, 2018). As formas subclínicas representam o maior problema para as explorações na medida em que estes animais são excretadores intermitentes e, conseqüentemente, responsáveis pela contaminação ambiental, sem que manifestem sinais clínicos de doença (Cutler, 2018).

Os animais com doença clínica apresentam síndrome da má absorção, em que não há diminuição da quantidade de alimento ingerida, apesar da perda constante de condição corporal. A lesão intestinal resultante da multiplicação bacteriana leva a graves perdas de proteína, o que resulta em hipoproteinémia e, conseqüentemente, a formação de edemas. Associa-se também a quebra acentuada na produção de leite, e a *performance* reprodutiva destes animais pode estar comprometida. Em estados avançados, o animal está emaciado, com diarreia crónica e profusa, que resulta em desidratação e morte (Fecteau, 2018). A principal via de infecção é a feco-oral, ainda que o MAP tenha sido isolado a partir do corrimento uterino, sémen e leite (Cutler, 2018).

Não existe tratamento para a paratuberculose, pelo que a identificação e eliminação de animais positivos é o método de controlo e eliminação do agente preconizado para a exploração. A ausência de resposta ao tratamento, os quadros de diarreia intermitente e a redução constante da condição corporal devem ser razão suficiente para serem tomadas medidas de biossegurança, de modo a quebrar o ciclo de transmissão, enquanto se aguarda confirmação serológica.

O diagnóstico de paratuberculose é difícil nos animais em que a infecção é latente, ou seja, que estão na fase subclínica. Uma vez que a libertação de bacilos é intermitente, as técnicas de cultura de fezes, microscopia, com a coloração de Ziehl-Neelsen e a prova ELISA facultam resultados falsos negativos com frequência (Cutler, 2018). O isolamento do agente é difícil, uma vez que o MAP tem um crescimento fastidioso em laboratório (Fecteau, 2018). Para além da cultura de fezes, a serologia tem elevado valor diagnóstico quando o animal está na fase clínica da doença, sendo que a especificidade do teste ELISA é de 99%, aproximadamente. Como a tuberculose bovina também é causada por um *Mycobacterium*, não existem certezas de reação cruzada devido ao teste da intradermotuberculização (Cutler, 2018), obrigatório em todos os bovinos adultos.

2.2.2.3. Sistema reprodutor

As afeções do sistema reprodutor representam uma parte considerável da chamada do médico veterinário à exploração. A distócia, torção uterina ou prolapso vaginal são exemplos de motivos de chamada de carácter urgente. Na tabela 4 registam-se os casos clínicos relacionados com o sistema reprodutor, em que as afeções do pós-parto, como a metrite, retenção das membranas fetais (RMF) e endometrite, assumem mais de metade da casuística registada.

Tabela 4: Distribuição dos casos clínicos do sistema reprodutor (n=109).

Sistema reprodutor	Fa (n)	Fr (%)
Metrite puerperal	37	34,0%
Retenção das membranas fetais (RMF)	24	22,0%
Distócia	22	20,2%
Endometrite	8	7,3%
Torção uterina	7	6,4%
Laceração vaginal	7	6,4%
Aborto	3	2,8%
Prolapso uterino	1	0,9%
Total	109	100%

No período do pós-parto, com o decorrer da involução uterina e retorno da atividade ovárica, é frequente surgirem infeções como a metrite e endometrite. Por metrite define-se a infeção uterina com sinais sistémicos, tais como febre, quebra na produção de leite, presença de corrimento sanguinolento com ou sem presença de material purulento, e odor fétido (Sheldon & Owens, 2017) que surge nos 21 dias após o parto (Reppert, 2015). A metrite puerperal aguda é uma doença sistémica, em que há presença de sinais sistémicos de toxémia, resultantes da infeção por *E. coli* (Haimerl & Heuwieser, 2014) que ocorre nos dez dias que se seguem ao parto (Gilbert, 2016). Na metrite ocorre a infeção das camadas mais profundas da parede uterina, ao

contrário da endometrite, em que a infecção é localizada a nível da mucosa. A metrite é uma doença mais severa que requer tratamento sistémico (Sheldon *et al.*, 2008).

A *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* e *E. coli* são os agentes mais prevalentes nos quadros clínicos de metrite. A infecção por estes agentes é responsável pela infiltração de neutrófilos e conseqüente inflamação da mucosa uterina (Reppert, 2015). O vírus do IBR tem sido isolado em múltiplos casos de metrite e sabe-se que tem tropismo para as células do endométrio (Sheldon *et al.*, 2008).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da metrite estão associados a trauma uterino, como a cesariana, parto distócico, aborto, parto gemelar e a RMF, associados a doença metabólica e ao ambiente em que ocorre o parto (Gilbert, 2016; Sheldon & Owens, 2017). A retenção de membranas fetais foi um dos fatores de risco frequentemente observado, tal como sugere a figura 3. O balanço energético negativo e o ciclo éstrico estão diretamente relacionados com a expressão dos mecanismos de defesa uterinos, uma vez que afetam a atividade dos neutrófilos. As vacas primíparas estão sob maior risco de desenvolver metrite (Giuliodori *et al.*, 2013; Reppert, 2015).



Figura 3: Placenta retirada de vaca com retenção das membranas fetais e conseqüente metrite puerperal.

Ainda que o diagnóstico de metrite seja simples e possa existir uma resposta ao tratamento, devem ser descartadas outras doenças frequentemente concomitantes, tais como pneumonia, deslocamento de abomaso, mastite e outras doenças sistémicas. As vacas com metrite apresentam maior risco de desenvolverem endometrite e deslocamento de abomaso. A metrite também contribui para uma maior taxa de refugo e um aumento no intervalo entre partos (Gilbert, 2016).

Os β -lactâmicos, administrados por via sistémica, são eficazes no tratamento e prevenção da metrite (Armengol & Fraile, 2014). Penicilina, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina e ceftiofur são antimicrobianos utilizados no tratamento da metrite, sendo que o ceftiofur tem provado atingir concentrações terapêuticas em todas as camadas uterinas (Reppert, 2015).

O tratamento preconizado nas vacas com metrite consistiu na administração de anti-inflamatório não esteroide, como a flunixinina-meglumina, na dose de 2,2mg por Kg de peso vivo, uma vez que tem ação anti endotóxica e antipirética. A escolha do antimicrobiano deveu-se à apresentação clínica do animal, em que nos casos com sinais clínicos mais severos administraram-se amoxicilina com ácido clavulânico (Synulox®) na dose de 8,75mg por Kg de peso vivo, por via intramuscular, durante três a cinco dias. A ampicilina (Albipen LA®) na dose 15mg por Kg de peso vivo, por via intramuscular, foi outro fármaco utilizado.

Em 2015, Armengol e Fraile realizaram um estudo em que a associação de antibioterapia sistêmica de amoxicilina, com oxitetraciclina em infusão intrauterina, permitiu que os animais assim tratados mostrassem melhor *performance* reprodutiva na gestação seguinte. Este tratamento também foi preconizado em alguns animais.

2.2.2.4. Glândula mamária

A mastite bovina é definida como a resposta inflamatória a uma infecção da glândula mamária (Gomes & Henriques, 2016). Esta afeição representa um elevado custo para os produtores, uma vez que há uma quebra na produção e alterações a nível da composição e qualidade do leite, tornando-o inviável para consumo, bem como o custo associado aos tratamentos necessários, à perda de animais e aos casos em que há reincidência da infecção (Klass & Zadocks, 2017; Jamali *et al.*, 2018). Pela tabela seguinte constata-se que esta doença representa a maioria dos casos clínicos relacionados com a glândula mamária.

Tabela 5: Distribuição de casos clínicos referentes a afeições da glândula mamária (n=72).

Glândula mamária	Fa (n)	Fr (%)
Mastite clínica	66	91,6%
Trauma e edema do ubere	3	4,2%
Obstrução do canal do teto	2	2,8%
Hiperqueratose dos tetos	1	1,4%
Total	72	100%

A etiologia da mastite bovina é ampla, em que diversos microrganismos como bactérias, algas, fungos e leveduras desempenham o papel de agentes patogénicos da doença (Bradley, 2002). As bactérias que causam mastite estão classificadas em dois grupos: agentes ambientais e agentes patogénicos contagiosos. No primeiro grupo estão os agentes oportunistas de mastite, presentes no meio ambiente que, ao invadirem a glândula mamária desencadeiam uma resposta inflamatória, pela sua rápida multiplicação, o que resulta em quadros de mastite clínica exuberantes. Neste grupo inserem-se os coliformes e outras enterobactérias como *Klebsiella spp* e *Streptococcus uberis* (Bradley, 2002; Schukken *et al.*, 2011).

Os agentes patogénicos contagiosos estão adaptados à glândula mamária, pelo que as infeções que provocam são mais insidiosas. Para além das mastites clínicas, provocam frequentemente infeções subclínicas, sem que existam alterações macroscópicas no leite e a mastite manifesta-se apenas pelo aumento da contagem de células somáticas, devido a um aumento de células epiteliais, leucócitos e neutrófilos. Destacam-se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus disgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* (Bradley, 2002; Gomes & Henriques, 2016).

O diagnóstico da mastite centra-se maioritariamente na deteção do aumento das células somáticas no leite, quando não existem outros sinais clínicos como o edema e tumefação do úbere. O teste californiano de mastites (TCM) permite aferir se existe um aumento semi-quantitativo de células somáticas no leite uma vez que a ação detergente do reagente dissolve as membranas das células presentes na amostra de leite e os seus ácidos nucleicos gelificam, tal como sugere a figura 4. A contagem de células somáticas (CCS) permite determinar quantitativamente o valor de células somáticas no leite. Outras técnicas, como a condutividade do leite e a pesquisa e análise de biomarcadores presentes no leite podem ser executados, ainda que existam limitações relativas ao custo destes ensaios e quanto à técnica laboratorial (Duarte *et al.*, 2015).

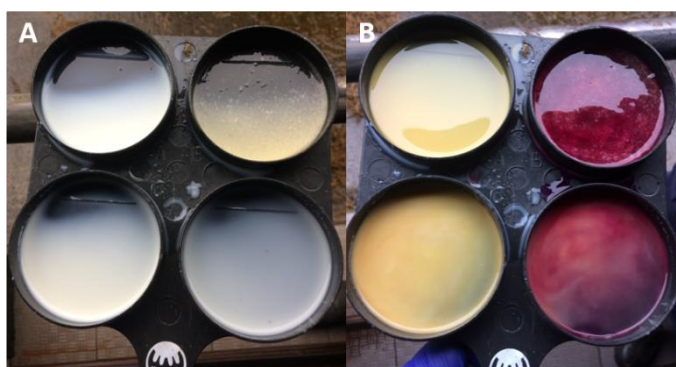


Figura 4: Realização do TCM. Antes (A) e depois (B) da aplicação do reagente Teepol.

A cultura e identificação dos agentes microbianos tem sido considerado o *gold standard* para o diagnóstico etiológico das mastites. Cada vez mais se utilizam outras técnicas que visam um diagnóstico mais rápido e com redução do número de falsos negativos, como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) e a deteção molecular. Estas técnicas estão em crescimento e cada vez mais serão utilizadas (Duarte *et al.*, 2015).

Relativamente aos casos de mastite observados, 21 foram hiperagudos, em que as vacas apresentavam sinais clínicos de choque e toxémia. Uma vez que a temática das mastites é bastante vasta, será descrita apenas a abordagem às mastites hiperagudas provocadas por *E. coli*, e respetiva descrição da patogenia.

O epitélio da glândula mamária tem recetores, os *toll-like receptors* (TLR), que permitem reconhecer os agentes patogénicos e as suas endotoxinas e transcrever diversos

imunomoduladores. Os macrófagos e neutrófilos presentes na glândula mamária também têm recetores, os CD14, que reconhecem o LPS das bactérias gram-negativas (Wellnitz & Bruckmaier, 2012).

A mastite hiperaguda ocorre como resultado de infecção por enterobactérias, como a *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Enterobacter aerogenes*. Outras bactérias gram positivas e gram negativas estão descritas como agentes de mastite hiperaguda (Bradley, 2002; Unnerstad *et al.*, 2009). As infecções provocadas por *E. coli* levam a quadros de endotoxemia uma vez que a membrana de LPS destas bactérias é constituída por endotoxinas que, ao entrarem em circulação, são responsáveis pela libertação de imunomoduladores, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e citocinas como a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-12 (IL-12). Por sua vez, estas citocinas induzem uma resposta inflamatória sistémica aguda, que se manifesta com o aumento da frequência cardíaca, frequência respiratória e febre (Ibrahim *et al.*, 2016; Breen, 2017). Estas citocinas vão regular a expressão de genes da resposta imunitária, que incluem outras citocinas, enzimas necessárias à síntese de eicosanoides e proteínas de fase aguda (Shukken *et al.*, 2011). As citocinas pro-inflamatórias vão ser responsáveis pela ativação da resposta imune inata, caracterizada pela atividade de mais neutrófilos, macrófagos, mastócitos, células *natural killer* e eosinófilos. Há libertação de aminas vasoativas, prostaglandinas, leucotrienos, derivados do ácido araquidónico, neuropéptidos, óxido nítrico e radicais livres do oxigénio, que regulam a resposta inflamatória. As ciclooxigenases vão converter o ácido araquidónico em prostaglandinas e tromboxanos, importantes mediadores da inflamação (Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Breen, 2017).

A interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e a interleucina-13 (IL-13), juntamente com o fator de transformação do crescimento β (TGF- β) suprimem a libertação de citocinas inflamatórias. São produzidas pelos linfócitos e bloqueiam a atividade do complexo maior de histocompatibilidade classe II (*major histocompatibility complex class II* - MHC-II). A IL-10 está envolvida na diferenciação e atividade dos linfócitos T e B e ocorre o aumento desta citocina no leite quando há infecção por *E. coli*. A função imunomoduladora do interferão (INF) induz a atividade dos macrófagos, com aumento da apresentação de antígenos e pela atividade dos lisossomas (Shukken *et al.*, 2011).

As quimiocinas são outro grupo de citocinas responsáveis pelo recrutamento das células efetoras para os locais onde ocorre a infecção. Macrófagos, monócitos, células *natural killer* e granulócitos fagocitam e eliminam as bactérias, ao passo que os linfócitos T e B induzem a resposta humoral (Shukken *et al.*, 2011).

Além da febre, aumento de frequência cardíaca e frequência respiratória, surgem sinais de desidratação, como o aumento do tempo de repleção capilar, aumento do tempo de retração da prega cutânea e enoftalmia, prostração e anorexia. Em casos avançados de toxemia ocorre

a congestão dos vasos da esclera, hipotermia e quadro de diarreia profusa. As vacas em toxemia podem ser encontradas em decúbito (Roberson, 2012).

O aspeto do leite nas mastites hiperagudas também está alterado. Nestas infeções, o leite surge com um aspeto aquoso e amarelado, com a presença de flóculos de pus. Pode-se observar sangue na amostra de leite (Bradley, 2002). Após o tratamento, o aumento na CCS pode persistir e alguns animais podem cessar a produção de leite dos quartos afetados (Soujara *et al.*, 2013).

Dos 21 animais observados com mastite hiperaguda, foi realizada a colheita de amostra de leite, cultura e identificação do agente, em que a *E. coli* foi isolada em todos os casos. O tratamento incluiu a administração endovenosa de soluções anti endotóxicas, como o Neatox®, 500ml por animal. Estas soluções, ricas em aminoácidos, vitaminas do complexo B e glucose, estão recomendadas em animais que apresentam quadros de toxemia.

A administração de 1000ml de solução salina hipertónica NaCl a 7,5%, para correção da desidratação, permitiu aumentar o volume intravascular de fluidos, por aumento da osmolaridade do plasma. Em animais com anorexia a suplementação com solução de glucose a 30% está recomendada.

Administrou-se dexametasona, na dose 1,4mg/Kg de peso vivo e nas fêmeas gestantes optou-se pelo uso de flunixin meglumina, na dose 2,2 mg/Kg de peso vivo, uma vez que os glucocorticoides podem induzir aborto.

Nas infeções por *E. coli*, os antimicrobianos podem exacerbar o quadro de toxemia, uma vez que a morte das bactérias aumenta a concentração de toxinas de LPS em circulação (Soujara *et al.*, 2013). Com a administração de glucocorticoides ou anti-inflamatórios não esteroides, é seguro e está recomendada a administração de antimicrobianos. A primeira escolha passou pelo uso de fluoroquinolonas, como a danofloxacina (Advocin®) ou a marbofloxacina (Marbosyva®), por via endovenosa, associadas à administração intramuscular de amoxicilina com ácido clavulânico (Synulox®), na dose 8,75mg por Kg de peso vivo. As fluoroquinolonas são fármacos lipossolúveis, pelo que têm uma boa dispersão pela glândula mamária e restantes tecidos (Soujara *et al.*, 2013).

Está recomendada a ordenha com total esvaziamento da cisterna do leite, com posterior aplicação de antimicrobiano tópico por bisnaga intramamária. A cefquinoma, cefalosporina de quarta geração, foi a principal escolha no tratamento das mastites hiperagudas.

Uma vez que os animais em toxemia estão frequentemente em anorexia, registou-se em grande número a síndrome de rúmen vazio. Para correção desta síndrome, foi implementada a fluidoterapia oral, com 20 a 30 litros de água, acompanhado de administração de uma saqueta de reconstituintes da flora ruminal, minerais e eletrólitos (YMPC®).

2.2.2.5. Desequilíbrios metabólicos

A hipocalcemia e a cetose foram os desequilíbrios metabólicos observados. Pela tabela 6 é possível compreender a diferente incidência que estas afeções têm nos efetivos leiteiros açorianos.

Os desequilíbrios metabólicos estão associados ao peri-parto nos bovinos leiteiros. As necessidades metabólicas sofrem um aumento significativo no período do parto, ao qual nem todos os animais conseguem responder de forma eficaz, sendo frequente a manifestação de desequilíbrios metabólicos de forma clínica ou subclínica.

Tabela 6: Distribuição de casos clínicos referentes a desequilíbrios metabólicos (n=69).

Desequilíbrios metabólicos	Fa (n)	Fr (%)
Hipocalcemia	61	88,4%
Cetose	8	11,6%
Total	69	100%

Para entender a hipocalcemia é necessário compreender o mecanismo de regulação do cálcio. O mineral assegura diversas funções a nível fisiológico e metabólico. A contração muscular, a transmissão do impulso nervoso, a produção de leite e colostro, o crescimento fetal, a motilidade intestinal e a libertação de acetilcolina estão dependentes da biodisponibilidade de cálcio (Oetzel, 2012; Rodríguez *et al.*, 2016).

O cálcio encontra-se distribuído pelo organismo, sendo que se concentra maioritariamente nos ossos. Para que haja homeostase do mineral, este tem de ter uma concentração de 2,2 a 2,5 mmol/L (8,5 a 10 mg/dL) no plasma sanguíneo (Goff, 2008; Gammon, 2014). Esta homeostasia está dependente da relação entre as perdas, as vias de absorção e a capacidade de armazenamento a nível ósseo. Nem todo o cálcio presente no organismo está fisiologicamente disponível para os processos químicos e metabólicos aos quais é necessário. Apenas o cálcio livre, que está ionizado, pode ser utilizado (Stilwell, 2013). Quando há diminuição da concentração plasmática de cálcio, o hipotálamo responde com a libertação de paratormona (PTH) na corrente sanguínea, que aumenta a reabsorção óssea de cálcio pelo aumento da atividade dos osteoclastos e reduz a excreção renal do ião (Goff, 2008).

A nível renal, a PTH também induz a expressão da enzima 1- α -hidroxilase, responsável pela ativação da vitamina D (25-hidroxicolcalciferol), formando-se a 1,25-dihidrocolcalciferol. Esta forma ativada da vitamina D vai atuar a nível dos enterócitos, pelo aumento da absorção intestinal de cálcio, por transporte ativo (Rodríguez *et al.*, 2016). A vitamina D pode ser sintetizada a partir da conversão fotoquímica do 7-dihidrocolesterol em colcalciferol (vitamina D₃), ao nível da pele ou pode ser obtida pela ingestão de plantas. De forma a ser utilizado, o colcalciferol tem de sofrer uma primeira hidroxilação no fígado (DeGaris & Lean, 2008), pelo que se resume:

- *conversão fotoquímica na pele:* 7-dihidrocolesterol → colcalciferol
- *hidroxilação no fígado:* colcalciferol → 25-hidroxicolcalciferol
- *hidroxilação no rim:* 25-hidroxicolcalciferol → 1,25-dihidrocolcalciferol

A atividade da PTH está dependente do magnésio, que é o cofator de ligação entre a hormona e os seus receptores. O pH também afeta a ligação da hormona (DeGaris & Lean, 2008; Gammon, 2014). Deste modo, a hipomagnesiémia afeta a secreção da PTH, bem como a sua ligação aos recetores e a alcalose metabólica diminui a reabsorção óssea e a atividade da PTH (Goff, 2008).

A maioria das vacas apresenta algum grau de hipocalcémia no período do parto (DeGaris & Lean, 2008). Valores de concentração plasmática compreendidos entre 1,38 e 2mmol/L (5,5 – 8mg/dL) são indicativos de hipocalcémia subclínica. Quando existe hipocalcémia clínica, a concentração plasmática de cálcio é inferior a 1,3 mmol/L (Goff, 2008). Ainda que os sinais clínicos apenas se manifestem nas vacas com hipocalcémia clínica, a doença subclínica apresenta igualmente consequências negativas a nível da produção de leite, predisposição para deslocamento do abomaso, aumento de incidência de outras doenças metabólicas e diminuição da ingestão de alimento (Oetzel, 2012).

Face à hipercalcemia, o organismo responde com a libertação de calcitonina, a nível das células C da tiroide. Esta hormona inibe a reabsorção óssea e aumenta a excreção renal de cálcio (Rodríguez *et al.*, 2016).

Existe um vasto conjunto de fatores de risco que contribuem para a hipocalcémia. Para além da hipomagnesiémia e da alcalose metabólica, animais mais velhos tendem a desenvolver hipocalcémia uma vez que têm menor capacidade de reabsorção óssea de cálcio e um menor número de recetores para a 1,25-dihidrocolcalciferol no intestino (DeGaris & Lean, 2008).



Figura 5: Vaca em decúbito devido a hipocalcémia clínica.

No tratamento das vacas com hipocalcémia é importante considerar a possibilidade de lesão anatómica, quando os animais são encontrados em decúbito, tal como na figura 5. A

etiologia da síndrome de vaca caída é extensa e a hipocalcémia assume-se como uma das principais causas.

Nos animais afetados procedeu-se à administração de 500ml solução de borogluconato de cálcio 144mg/ml, por via endovenosa lenta, 500ml de solução de glucose a 30%, para tratamento da cetose secundária e 50ml de Frecosol®, uma vez que este fármaco tem hipofosfito de magnésio, pela mesma via. Incluir fósforo e magnésio no tratamento da hipocalcémia prende-se com a sintomatologia semelhante nas situações de hipomagnesiémia e hipofosfatémia, assim como pela frequência com que estas surgem associadas. A monitorização da frequência cardíaca durante a administração de cálcio por via endovenosa deve ser rigorosa, uma vez que o aumento significativo da concentração plasmática de cálcio num curto espaço de tempo pode resultar em bradicardia (Oetzel, 2012).

Para que haja homeostasia do cálcio, o fígado deve responder às necessidades metabólicas que lhe são exigidas, com a metabolização da vitamina D, pelo que é frequente a insuficiência hepática secundária a fígado gordo, no período do peri-parto. Administrou-se dexametasona, na dose de 1,3mg/Kg de peso vivo e 100ml de Ornipur®[®], pela via endovenosa. O Ornipur®[®] está recomendado no tratamento de insuficiência hepática, sendo constituído por sorbitol, betaína, L-arginina, L-ornitina e L-citrulina, importantes no metabolismo lipídico e com função hepato-protetora.

Nos animais com hipocalcémia subclínica deve-se preconizar a administração de cálcio por via oral, uma vez que permite manter a concentração plasmática até seis horas, quando administrado por esta via (Oetzel, 2012). Para manutenção das concentrações plasmáticas de cálcio, aplicou-se uma bala de cálcio, Bovicalc®, por via oral, o que preveniu reincidência de hipocalcémia clínica.

2.2.2.6. Sistema musculoesquelético

As lesões a nível do sistema musculoesquelético são uma causa de refugo considerável no sistema de produção leiteira da região dos Açores. A claudicação manifesta-se com alguma frequência como resultado do sistema de produção e de manejo, em que os animais deslocam-se por pisos abrasivos nas mudanças de pastagem.

As luxações e fraturas resultaram de traumas associados ao transporte e à permanência em pastagem. Além das afeções associadas a trauma, nos vitelos registaram-se quatro casos de poliartrite séptica e um caso de contratura tendinosa. As lesões associadas ao parto, como a lesão por compressão do nervo ciático e obturador são as mais frequentes, tal como se observa na tabela 7, pelo que será seguidamente descrita.

Tabela 7: Distribuição dos casos clínicos do sistema musculoesquelético (n=39).

Sistema musculoesquelético	Fa (n)	Fr (%)
Lesão do nervo ciático e obturador	16	41,0%
Claudicação	8	20,5%
Trauma musculoesquelético	5	12,8%
Poliartrite séptica	4	10,3%
Fratura óssea	2	5,1%
Luxação da articulação coxofemoral	2	5,1%
Luxação da articulação úmero-radio-ulnar	1	2,6%
Contratura tendinosa	1	2,6%
Total	39	100%

O nervo ciático tem origem nas raízes nervosas de L6-S2 e divide-se em dois ramos: o ramo tibial e o ramo fibular. São responsáveis pela inervação dos músculos extensores e flexores do boleto, respetivamente. O nervo ciático inerva também os músculos extensores da bacia e do curvilhão, bem como os músculos flexores da soldra. O nervo obturador tem origem nas raízes nervosas de L4-L6 e é responsável pela adução do membro pélvico, através da inervação dos músculos adutores da coxa. Quando os animais não se conseguem manter em estação deve-se considerar a lesão dos dois nervos em simultâneo (Hartnack, 2017).

A lesão primária surge em partos distócicos e situações de trauma, em que há uma compressão dos nervos e, menos frequente, a rutura dos ramos nervosos (Hartnack, 2017). Todas as afeções que levem ao decúbito prolongado provocam, secundariamente, a lesão por compressão dos nervos (Poulton *et al.*, 2016).

Deste modo, a lesão do nervo ciático e/ou obturador pode ser classificada como uma causa ou consequência da síndrome de vaca caída, em que a lesão anatómica, primária ou secundária, impossibilita que o animal se mantenha em estação.

O maneio da vaca com lesão do nervo ciático e/ou obturador é fundamental para a recuperação do animal. Muitas vezes é necessário recorrer à pinça ilíaca, com o auxílio de um trator, para que a vaca fique em estação. Este procedimento deve ser feito o máximo de vezes possíveis durante o dia, sendo que pelo menos duas vezes foram recomendadas nos casos observados. Pode-se recorrer à colocação de peias nos animais com lesão do nervo obturador, de modo a promover a adução do membro pélvico.

Nos períodos em que a vaca está em decúbito, todos os cuidados que forem possíveis prestar apresentam resultados positivos na recuperação. Colocar alimento e água à disposição, ter em atenção o tipo de solo sobre o qual se coloca o animal e fazer um correto controlo da dor são exemplos de fatores que contribuem para uma melhor recuperação (Poulton *et al.*, 2016).

Para controlo da inflamação local, fez-se a administração de dexametasona, por via epidural, acompanhada de uma administração por via intramuscular do mesmo fármaco (5ml de vetacort® por via epidural e 15ml de vetacort® via intramuscular). Ainda que o seu efeito seja controverso, fez-se a administração de vitaminas do complexo B (Syvabe®) para auxílio na regeneração dos nervos.

2.2.2.7. Pele e anexos

Nas afeções da pele e anexos, a presença de abscessos registou a maior frequência. A fotossensibilidade, bastante frequente nos Açores, será descrita neste relatório. A onfalite e a miíase foram observadas em vitelos, com uma frequência de cinco e seis casos respetivamente, como se regista na seguinte tabela.

Tabela 8: Distribuição de casos clínicos da pele e anexos (n=34).

Pele e anexos	Fa (n)	Fr (%)
Abcesso	10	29,4%
Fotossensibilidade	8	23,5%
Miíase	6	17,7%
Onfalite	5	14,7%
Fibropapilomas cutâneos	5	14,7%
Total	34	100%

Os fibropapilomas cutâneos são causados por vírus da família *Papillomaviridae*. Atualmente conhecem-se 14 tipos de *papillomavirus* bovino, sendo que o tipo 1 e 2 estão associados à formação de lesões cutâneas (Gil da Costa *et al.*, 2017). Ainda que o tratamento dependa da resposta imunitária do animal, nos casos clínicos acompanhados estabeleceu-se um plano de auto-hemoterapia, devido aos bons resultados que tem demonstrado. A localização dos fibropapilomas é muito variada, sendo que na maioria dos casos observados as lesões surgiram ao nível dos membros posteriores e anteriores, tábua do pescoço e face, com o aspeto das lesões da figura 6.

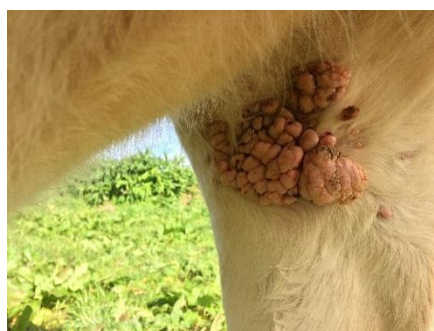


Figura 6: Fibropapilomas cutâneos na face interna do membro posterior direito de uma novilha.

Outra afeção frequente nos efetivos bovinos da ilha de São Miguel é a fotossensibilidade. Classifica-se a fotossensibilidade como primária ou secundária. A ingestão de agentes fotodinâmicos, presentes em algumas plantas e fármacos, resulta na manifestação primária da doença. A fotossensibilidade secundária ocorre devido à insuficiência hepática, provocada por toxinas presentes na alimentação, que resulta no aumento das concentrações séricas de filioeritrina, um metabolito da clorofila que requer metabolização e eliminação hepática (Stilwell, 2013).

A esporidesmina, uma toxina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum*, está associada à insuficiência hepática pela colangite e consequente oclusão dos canais biliares que provoca. Nos Açores, uma vez que se reúnem condições propícias ao seu crescimento e esporulação, é frequente a contaminação das pastagens com este fungo e, conseqüentemente, o aparecimento de surtos de fotossensibilidade secundária nas explorações leiteiras (Pinto *et al.*, 2005).

Ainda que exista um período de latência entre a manifestação da fotossensibilidade e a ingestão de esporidesmina de 10 a 14 dias, existem sinais precoces da intoxicação como diarreia transitória, quebra na produção de leite e diminuição da ingestão de alimento (Pinto *et al.*, 2005), vocalização devido à dor, bruxismo, depressão e os animais apresentam-se curvados, com sinais de cólica e agitados (Golder *et al.*, 2017).

As lesões de fotossensibilidade caracterizam-se pelo eritema e edema das zonas da pele não pigmentadas, resultantes de uma dermatite fotodinâmica, que evoluem para lesões de necrose e gangrena. Pode surgir erosão do epitélio das mucosas e lesões a nível do úbere (Rodrigues, 2014; Golder *et al.*, 2017). Em fase de resolução, observaram-se as zonas de alopecia com hiperqueratose e descamação, como se observa na figura 7.



Figura 7: Lesões cutâneas de fotossensibilidade secundária em fase de resolução.

O tratamento e prevenção da fotossensibilidade secundária consiste na administração de zinco, por via oral, sob a forma de óxido de zinco ou sulfato de zinco, uma vez que tem a capacidade de se ligar à esporidesmina e bloquear a sua oxidação (Pinto, *et al.*, 2005). Para além da administração de zinco por via oral, fez-se o tratamento de suporte para a insuficiência hepática, com administração de multivitamínicos e Ornipural®, controlo da dor com anti-inflamatório (Vetalgin®) e recomendou-se evitar a exposição direta à luz solar dos animais afetados.

2.2.2.8. Outros casos

Na tabela 9 estão enumeradas as afeções classificadas como “outros casos”. A meningite em vitelos está associada a quadros de septicémia com origem nas diarreias neonatais. No período pós-cirúrgico, dois animais surgiram com peritonite, sendo esta uma complicação cirúrgica frequente nas cirurgias do aparelho digestivo dos ruminantes. A queratoconjuntivite infecciosa bovina representa a maioria dos casos registados neste tópico, pelo que será discutida seguidamente.

Tabela 9: Distribuição de casos clínicos classificados como outros casos (n=25).

Outros casos	Fa (n)	Fr (%)
Queratoconjuntivite infecciosa bovina	9	36,0%
Meningite	6	24,0%
Lesão ocular por trauma	3	12,0%
Reação anafilática	3	12,0%
Peritonite	2	8,0%
Carências nutricionais	2	8,0%
Total	25	100%

O agente da queratoconjuntivite infecciosa bovina, *Moraxella bovis*, é uma bactéria gram-negativa que adere à superfície da córnea pelas suas fímbrias e produz citotoxinas com atividade leucotóxica, que provocam a lesão no epitélio corneal (Angelos, 2015). Outros agentes, como a *Moraxella bovoculi*, *Moraxella ovis* ou *Mycoplasma bovocoli*, têm sido isolados em animais com queratoconjuntivite (Schnee *et al.*, 2015). É uma doença altamente contagiosa, uma vez que a transmissão pode ocorrer por contacto direto, corrimento nasal e ocular, assim como por vetores. A lesão da córnea vai progredindo, pelo que no início apenas existe opacidade da córnea, que evolui para edema e úlcera da córnea (Schnee *et al.*, 2015) que levam à cegueira, caso não se institua qualquer tratamento. Os principais sinais clínicos são o corrimento ocular, que pode ser purulento, a fotofobia e o blefaroespasma. À observação, a opacidade da córnea é sugestiva de queratoconjuntivite infecciosa bovina (Angelos, 2015; Schnee *et al.*, 2015). Animais infetados com

BoHV-1 e *Mycoplasma spp*, apresentam maior risco de desenvolver a doença, uma vez que estes agentes facilitam a adesão e lesão do epitélio corneal (Angelos, 2015).

O tratamento consistiu na administração de oxitetraciclina por via subconjuntival. Em fases iniciais da lesão, em que não se observa úlcera da córnea, associou-se dexametasona (Vetacort®) ao tratamento, pela mesma via de administração. Os volumes administrados dependeram do tamanho do animal, sendo que em bovinos adultos foram administrados 10ml de oxitetraciclina (Calimicina®) e 4ml de Vetacort®. O tratamento com oxitetraciclina promove a formação de uma reação local dos tecidos, que resulta na oclusão total das pálpebras, o que permite proteger o olho dos agentes de agressão externos, como a radiação ultravioleta e poeiras. Em vitelos, fez-se a aplicação tópica de penicilina, pelo período de cinco dias, duas vezes por dia.

2.2.3. Clínica cirúrgica

Neste ponto aborda-se a clínica cirúrgica acompanhada no estágio. O DAE foi a cirurgia mais frequente, sendo que representa quase metade do total de casos. Os restantes procedimentos cirúrgicos estão discriminados na tabela 10.

Tabela 10: Distribuição dos casos clínicos de patologia cirúrgica (n=21).

Clínica cirúrgica	Fa (n)	Fr (%)
Deslocamento de abomaso à esquerda (DAE)	9	42,8%
Abomasopexia paralombar esquerda		
Exérese de carcinoma da terceira pálpebra	7	33,3%
Sutura de feridas	3	14,3%
Laparotomia exploratória	1	4,8%
Acesso paralombar direito		
Cesariana	1	4,8%
Total	21	100%

A exérese de carcinomas da terceira pálpebra foi outra cirurgia frequentemente realizada uma vez que a pelagem branca dos animais e a exposição ao sol por longos períodos do dia são fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento deste tipo de tumores (Tsujiita & Plummer, 2010).

O deslocamento de abomaso surge maioritariamente nas primeiras semanas após o parto e o seu deslocamento à esquerda é mais frequente que à direita, ainda que ambos ocorram com relativa frequência (Radostiits *et al.*, 2006). Ainda que a etiologia do DAE seja multifatorial, todas as situações que resultam na diminuição da ingestão de alimento, mais concretamente alimento forrageiro e hipomotilidade abomasal colocam o animal predisposto à acumulação de gás e conseqüentemente ao deslocamento visceral (Smith, 2014).

Nos sistemas de produção leiteiros, as vacas encontram-se separadas por grupos, em que a alimentação difere consoante a fase produtiva em que se encontram: vacas em lactação tendem a necessitar de alimento concentrado para suprir as necessidades energéticas, em complemento ao alimento forrageiro, como o feno, a palha ou pastagem, de modo a manterem os seus níveis de produção. O grupo de vacas que não se encontram em lactação estão sujeitas a uma alimentação com menor teor energético, uma vez que as suas necessidades metabólicas são bastante inferiores.

Para além das alterações fisiológicas que ocorrem no peri-parto, as alterações alimentares representam um fator de risco para que ocorra o deslocamento de abomaso. É imperativo, para que se reduza a incidência de deslocamentos de abomaso numa exploração, que o manejo alimentar seja rigoroso e alterado de forma gradual, através da inserção de alimento concentrado nas duas a quatro semanas que antecedem o parto. Estas alterações graduais permitem uma melhor adaptação do animal no início da lactação.

Bovinos com DAE podem apresentar anorexia, com momentos de apetite normal ou redução no consumo de alimentos concentrados, diminuição da produção de leite e cetose secundária. A temperatura retal pode estar aumentada caso existam infeções concomitantes, como metrite puerperal ou pneumonia. Apresentam menor conteúdo fecal à palpação transrectal (Radostits *et al.*, 2006; Smith, 2014).

O diagnóstico é estabelecido a partir da auscultação-percussão combinadas, em que é notório o som de *ping*, uma vez que o abomaso está sob tensão, com líquido e gás no seu interior. É fundamental considerar os diagnósticos diferenciais de *pings* na área abdominal esquerda: timpanismo ruminal, síndrome do rúmen vazio e pneumoperitoneu. Ainda que raro, estão descritos casos de deslocamento de ceco à esquerda do rúmen (Smith, 2014).

Existem várias abordagens cirúrgicas para a correcção do DAE. Neste relatório descreve-se a abomasopexia paralombar esquerda, técnica aplicada nos casos observados.

A sedação ligeira para a realização do procedimento cirúrgico consistiu na administração de xilazina (Nerfasin®), na dose de 0,02mg por Kg de peso vivo por via endovenosa. O local de incisão foi infiltrado com Pronestestic®, um fármaco que associa procaína e epinefrina, que reduz a hemorragia a nível local uma vez que promove a vasoconstrição. Utilizou-se aproximadamente 200ml de anestésico local para realizar a infiltração,

Após preparação do campo cirúrgico, com tricotomia, lavagem e desinfeção da pele com passagem de solução de iodopovidona e álcool etílico a 96%, repetidas por 3 vezes, fez-se a incisão da pele, no centro da fossa paralombar esquerda, seguindo-se pela camada muscular externa, constituída pelos músculos oblíquo externo e oblíquo interno e incisão da camada muscular interna, com a secção do músculo transversal do abdómen, até incidir sobre o peritoneu e aceder à cavidade abdominal.

Com o auxílio de uma agulha acoplada a uma mangueira, fez-se o esvaziamento do abomaso, para libertação do gás acumulado pelo deslocamento visceral. Os pontos de sutura no abomaso, de modo a permitirem a sua fixação crânio-dorsal direita à cicatriz umbilical, foram realizados com fio não absorvível (Supramid®) tamanho seis USP, num padrão contínuo travado de *Ford*. Com a fixação do abomaso na sua posição anátomo-fisiológica promove-se uma reação local com desenvolvimento de tecido cicatricial que faz a adesão do abomaso à parede abdominal, impedindo o seu deslocamento.

O encerramento da ferida cirúrgica foi feito em três camadas: sutura com pontos simples em cruz, do músculo transverso do abdómen, incluindo o peritoneu; encerramento da camada muscular externa, com sutura contínua simples; sutura da pele com sutura contínua travada de *Ford*. As suturas das camadas musculares foram realizadas com fio absorvível (Catgut®) tamanho seis USP e na sutura de pele utilizou-se Supramid® seis USP. Na figura 8 está representado o procedimento cirúrgico.

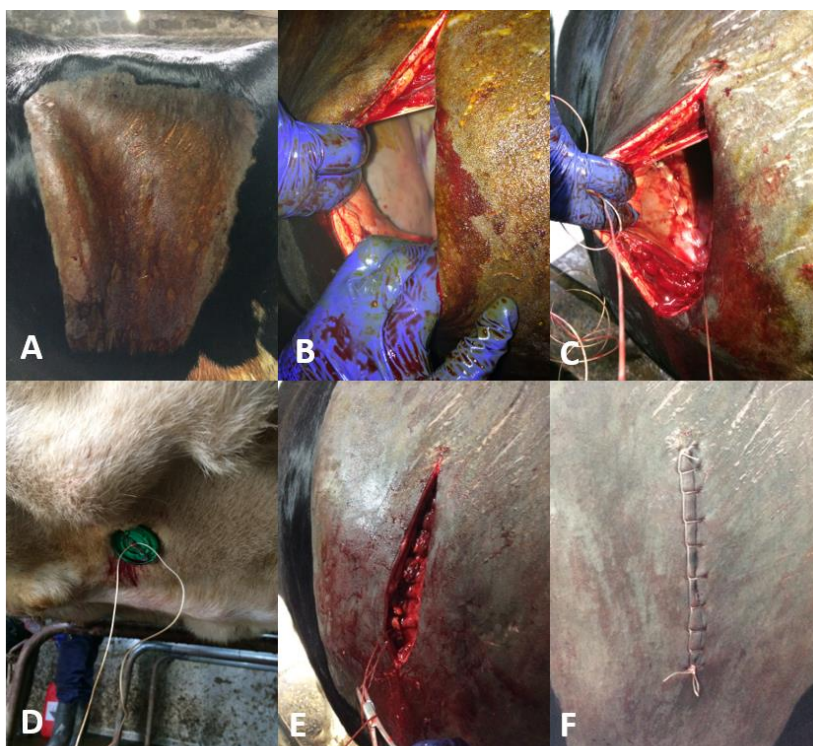


Figura 8: Etapas da resolução cirúrgica de DAE. Preparação do campo cirúrgico (A), acesso à cavidade abdominal e identificação do abomaso (B), sutura do abomaso (C), fixação do abomaso na posição anátomo-fisiológica (D), encerramento da segunda camada muscular (E) e sutura da pele (F).

Fez-se a administração de penicilina G procaína em associação com dihidroestreptomicina (Pendistrep®) durante cinco dias, na dose de 12.000UI por Kg de peso vivo, via intramuscular. O controlo da dor consistiu na administração de Vetalgín®, na dose de 40mg por Kg de peso vivo via endovenosa, no momento da cirurgia e administração de flunixinameglumina (Megluvet®), na dose 2,2mg por Kg de peso vivo, nos três dias seguintes, por via

intramuscular. O uso do metamizol (Vetalgin®) prende-se com o facto de ter ação antiespasmódica além de ação analgésica. Como o seu poder anti-inflamatório é reduzido, recorreu-se à flunixinina-meglumina para controlo da dor e inflamação nos dias que sucederam à cirurgia.

O restante tratamento de suporte esteve sempre dependente do estado clínico do animal, das infeções concomitantes existentes e da severidade dos sinais clínicos no momento da cirurgia.

2.2.4. Controlo reprodutivo

Na tabela 11 estão registados os procedimentos efetuados no decurso do acompanhamento reprodutivo às explorações, assim como algumas afeções observadas nessas mesmas intervenções.

Tabela 11: Distribuição da casuística observada no controlo reprodutivo às explorações (n=332).

Controlo reprodutivo	Fa (n)	Fr (%)
Diagnóstico de gestação	191	57,5%
Avaliação da atividade ovárica	63	19,0%
Sincronização deaios	28	8,4%
Colocação de PRID para suplementação de progesterona	17	5,1%
Inseminação artificial	14	4,2%
Quisto ovárico	7	2,1%
Palpação pré-parto	6	1,8%
Indução do parto	4	1,2%
Tumor ovárico	1	0,3%
Diagnóstico de Freemartinismo	1	0,3%
Total	332	100%

O diagnóstico de gestação representa a maioria das intervenções, seguido pela avaliação da atividade ovárica e a implementação de protocolos de sincronização deaios. Das afeções registadas destacam-se os quistos ováricos, com sete casos clínicos e o diagnóstico de um tumor ovárico.

No acompanhamento reprodutivo de uma exploração, o diagnóstico de gestação e a avaliação da atividade ovárica são procedimentos frequentemente realizados. Ainda que a maioria dos produtores recorram à inseminação artificial após deteção do cio, alguns utilizam a cobertura natural com relativa frequência nas suas explorações. Por estas razões, é importante o exame do sistema reprodutivo, quer para a avaliação da atividade ovárica, quer para diagnóstico de gestação, morte embrionária e aborto.

O diagnóstico de gestação pode ser realizado a partir dos 21 dias de gestação, com recurso a ecografia transretal, mas está dependente das características do equipamento e requer um operador experiente. Aos 21 dias de gestação já se iniciou a implantação do embrião e as carúnculas começam a formar-se. É possível observar o batimento cardíaco (Fricke *et al.*, 2016). Em fêmeas com uma gestação de 35 dias é possível o diagnóstico por palpação transretal, dependente da experiência do médico veterinário, pelo que só ao dia 45 é que se consegue fazer um diagnóstico preciso (Maxwell, 2007; Fricke *et al.*, 2016).

Por palpação transretal, o diagnóstico de gestação deve ser baseado na deteção e avaliação dos seguintes indicadores de gestação: palpação do feto, palpação dos placentomas, palpação da vesícula amniótica e palpação da membrana corioalantóide (Maxwell, 2007).

O diagnóstico de gestação precoce, antes dos 45 a 60 dias de gestação, pode resultar na morte embrionária, uma vez que a palpação do embrião pode levar à morte do mesmo, ainda que não seja reunido o consenso sobre os efeitos negativos do exame nem da frequência com que ocorre, pela dependência do operador e do animal que este exame tem (Pohler *et al.*, 2016).

Frequentemente, é necessário determinar o tempo de gestação, sendo que os critérios a avaliar são: a posição do útero e a presença de conteúdo líquido no seu interior, tamanho dos cornos uterinos e relativa desproporção entre eles, deteção e avaliação do pulso arterial das artérias uterinas esquerda e direita (Maxwell, 2007).

Os quistos foliculares ocorrem quando um folículo que não ovulou mantém-se por mais de 10 dias e atinge um diâmetro igual ou superior a 25 mm. Ainda que a sua produção de estradiol possa ser elevada, não há uma resposta à hormona luteínica (LH), para que ocorra a ovulação. Surgem associados ao balanço energético negativo, baixa condição corporal e por fatores genéticos (Gilbert, 2016).

2.2.5. Provas laboratoriais

Apenas duas provas laboratoriais foram realizadas, sendo que a cultura, identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) registou a maior frequência, com 61 testes feitos num total de 74. Os restantes foram contagens de células somáticas, tal como se observa na tabela 12.

Tabela 12: Distribuição de provas laboratoriais realizadas (n=74).

Provas laboratoriais	Fa (n)	Fr (%)
Cultura, identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)	61	82,4%
Contagem de células somáticas (CCS)	13	17,6%
Total	74	100%

A realização de exames complementares de diagnóstico está bastante limitada nas espécies pecuárias. Porém, a realização de provas laboratoriais como os TSA têm um papel cada vez mais importante na escolha das opções terapêuticas, já que se prevê uma política de uso de antimicrobianos cada vez mais restrita.

A AJAM-CJA dispõe de um laboratório de qualidade do leite, onde os médicos veterinários e o técnico microbiologista realizam os TSA à maioria dos casos clínicos de mastite. Desta forma, a escolha de antimicrobianos é direcionada para os fármacos com melhor ação *in vitro*. Ainda que numa primeira abordagem seja necessária a aplicação de antimicrobianos, após o isolamento e identificação do agente, bem como da leitura do respetivo TSA, pode-se manter ou alterar a antibioterapia instaurada, o que permite eliminar os agentes infecciosos de forma eficaz e diminuir o número de resistências às moléculas disponíveis.

3. Revisão bibliográfica sobre doença respiratória bovina, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina

3.1. Introdução

A diarreia viral bovina (BVD) e a IBR são doenças de etiologia viral que afetam os bovinos. Ambos estão associados à DRB, uma síndrome que afeta animais em todo o mundo, em todos os sistemas de produção (Fulton, 2009; Taylor *et al.*, 2010). Esta síndrome reúne um conjunto de fatores associados ao seu estabelecimento, sendo que esta revisão bibliográfica é dirigida aos agentes etiológicos virais em concreto.

Ainda que as manifestações respiratórias predominem nos quadros de infecção pelo BVDV e BoHV-1, estão descritas variadas manifestações a nível reprodutivo associadas a estas doenças (Newcomer & Givens, 2016), o que justifica a pertinência do estudo de caso que adiante será apresentado. Deste modo, serão abordados em detalhe a etiologia, epidemiologia e transmissão dos agentes, a sua patogenia, manifestações clínica e reprodutiva, assim como as principais estratégias de controlo e erradicação executadas.

3.2. Doença Respiratória Bovina

A DRB é considerada uma síndrome que se caracteriza pela doença pulmonar dos bovinos sendo a principal manifestação clínica a pneumonia que, conseqüentemente, resulta num conjunto de possíveis lesões com impacto na produtividade dos bovinos. A etiologia da DRB é complexa e multifatorial, pelo que se destacam os fatores associados aos agentes infecciosos, ao meio ambiente e ao próprio hospedeiro (Murray *et al.*, 2017), resumidos pela figura 9. Nos últimos anos foi possível reduzir a incidência de DRB em muitas explorações, compreender os mecanismos de patogénese dos agentes infecciosos envolvidos, assim como o sinergismo entre vírus e bactérias, desenvolver múltiplas vacinas para os diferentes agentes, identificar e isolar diferentes estirpes virais e, por último, elaborar e executar planos de controlo e monitorização eficazes (Fulton, 2009).

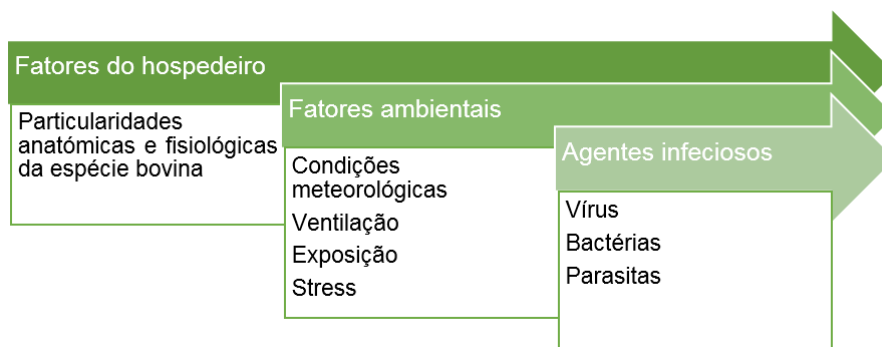


Figura 9: Representação esquemática dos fatores associados ao estabelecimento da doença respiratória bovina.

3.2.1. Fatores ambientais

As condições ambientais, os sistemas de produção e o transporte estão diretamente ligados à ocorrência da DRB. Por si só, os sistemas de manejo intensivo podem conduzir a quadros de *stress* que predispõe para a DRB, muito frequentes nas engordas de bovinos, mas outros fatores associados às condições meteorológicas levam a que haja *stress* térmico devido a temperaturas altas, assim como a exposição a poeiras e lama, humidade relativa do ar baixa ou alta e a exposição à pluviosidade afetam diretamente a incidência de DRB (Mosier, 2015).

A sazonalidade resulta da interação entre as condições climatéricas e o efeito que tem sobre a imunidade e a exposição aos fatores de *stress* para os animais (Murray *et al.*, 2017). A zona de termoneutralidade refere-se ao intervalo de temperatura no qual a produção de calor é independente da temperatura externa, ou seja, o animal está confortável e não precisa de direcionar o seu metabolismo para mecanismos de produção ou perda de calor. Quando estão em *stress* térmico, os animais não conseguem perder ou produzir calor suficiente para regular a temperatura corporal pelos mecanismos fisiológicos de que dispõem. Para além da temperatura ambiente, a humidade, o vento e a exposição solar afetam o estado de *stress* térmico. Deste modo, a temperatura à qual os bovinos sofrem de *stress* térmico resulta da associação de diferentes parâmetros climáticos (Roland *et al.*, 2016).

Os sistemas de produção e o manejo afetam diretamente o contributo dos fatores ambientais para o desenvolvimento de doença respiratória. Sabe-se que a incidência da DRB em vitelos é menor quando estes estão sujeitos a ventilação natural das instalações de recria ou ao ar livre, comparativamente com sistemas com ventilação controlada (Roland *et al.*, 2016).

O transporte de animais é considerado o principal fator ambiental para o estabelecimento da doença, uma vez que é responsável por uma diminuição das defesas do hospedeiro devido ao aumento do cortisol sérico. Fatores associados ao transporte, como a distância, a duração da viagem, o meio de transporte e a desidratação mostraram ter um desempenho na patogenia e estabelecimento da doença em diversos estudos (Taylor *et al.*, 2010).

3.2.2. Fatores do hospedeiro

O próprio hospedeiro reúne um conjunto de fatores anatomofisiológicos e imunitários que contribuem para a DRB. Em primeiro lugar, os bovinos têm uma árvore brônquica relativamente longa quando comparada com as outras espécies de animais domésticos. Isto resulta num grande volume de espaço morto pulmonar, que aumenta o risco de hipoventilação alveolar. A densidade capilar dos pulmões também é inferior às restantes espécies, existindo zonas com hipoperfusão. A ventilação colateral também é reduzida devido à falta de comunicações broncoalveolares, interbronquiolares e ausência de poros alveolares (Ackermann *et al.*, 2010; Potter, 2015).

O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), como o LPS, o ácido teicóico de bactérias gram-positivas ou duplas cadeias de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* - RNA) é feito pelo epitélio, macrófagos alveolares e macrófagos em circulação. Com o reconhecimento dos PAMPs ocorre a liberação de leucotrienos e tromboxanos, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e pela atividade das células dendríticas pulmonares, linfócitos T e B e células *natural killer*. O epitélio pulmonar também apresenta TLR para o reconhecimento de agentes patogênicos, liberação de citocinas inflamatórias e fatores reguladores do interferão (Ackermann *et al.*, 2010).

Porém, a resposta imune inata do hospedeiro é também responsável pela lesão pulmonar. A infiltração do trato respiratório por neutrófilos é excessiva e o diâmetro destas células é superior ao diâmetro da maioria dos capilares pulmonares, o que não permite a atividade macrofágica dos macrófagos sobre os linfócitos, nem a sua entrada em circulação. Os neutrófilos liberam mediadores inflamatórios que fazem o recrutamento de mais neutrófilos para o local de infecção e o facto de a apoptose ser retardada contribuem para um aumento da lesão dos tecidos. A fosfatase alcalina, mieloperoxidase, óxido nítrico, elastase e metaloproteínases, presentes nos linfócitos, são nocivos para o epitélio pulmonar (Earley *et al.*, 2017).

Nos vitelos, as falhas de transferência de imunidade passiva, as quantidades insuficientes de proteína e energia fornecidas pelo aleitamento e os períodos de transição para alimentos sólidos constituem fatores de risco para o desenvolvimento de DRB associados ao hospedeiro (Mahendran, 2018).

3.2.3. Agentes etiológicos virais

Os principais agentes etiológicos virais da DRB são: BVDV, BoHV-1, BRSV e Pi-3. Todos estes vírus têm uma distribuição mundial e são considerados endêmicos em grande número de explorações (Potter *et al.*, 2017). O coronavírus bovino é indicado por alguns autores como o quinto agente viral da DRB. Tem vindo a ser isolado em vitelos doentes e bovinos após o transporte, a partir de amostras pulmonares e zaragatoas nasais. A sua inclusão como agente viral da DRB carece de mais estudos uma vez que tem surgido sempre associado a outros vírus e bactérias, o que não permite estabelecer o seu contributo como agente etiológico desta síndrome (Fulton, 2009).

As bactérias associadas à DRB são bactérias comensais, presentes no trato respiratório dos bovinos. Com a redução dos fatores de defesa do organismo, pela agressão causada pelos vírus, os microrganismos bacterianos encontram reunidas as condições favoráveis ao seu crescimento e multiplicação. *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis* e *Histophilus somni* são os principais agentes bacterianos envolvidos na etiologia da DRB (Fulton, 2009; Hilton, 2014; Potter *et al.*, 2017). Outros agentes podem estar envolvidos, como a

Truelperella pyogenes (Holman *et al.*, 2015). Deste modo, estes agentes bacterianos manifestam-se pelos quadros de pneumonia secundária à diminuição da resposta imunitária do hospedeiro, resultante da infecção viral primária (Griffin *et al.*, 2010).

Na descrição da casuística observada no decurso do estágio foram abordados os agentes bacterianos supracitados. Deste modo, e por se tratar de uma revisão bibliográfica sobre os agentes virais da DRB com destaque para o BVDV e BoHV-1, este trabalho será direcionado para estes vírus, sendo que primeiramente serão descritos o BRSV e o Pi-3.

3.2.3.1. Vírus respiratório sincicial bovino

O BRSV é um vírus do género Pneumovírus, que pertence à família *Paramyxoviridae*. Constituído por um envelope e com uma cadeia simples de RNA que codifica 11 proteínas, é considerado o principal agente da doença respiratória em vitelos (Valarcher & Taylor, 2007). Das proteínas codificadas pelo vírus, três são glicoproteínas transmembranares, presentes no envelope viral, três proteínas constituem a matriz e estão presentes na face interna do envelope, duas proteínas não estruturais que estão presentes nas células infetadas em grandes quantidades e três proteínas constituintes da nucleocápside (Guzman & Taylor, 2015).

Na partícula viral existem três glicoproteínas de superfície: a glicoproteína G, que permite a sua adesão às células do hospedeiro e pode ser neutralizada por anticorpos que impedem a adesão; a proteína F, responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira e pela fusão da membrana citoplasmática de células infetadas e não infetadas e por fim, a proteína hidrofóbica pequena SH (*Small Hydrophobic*) que não sendo fundamental ao mecanismo de replicação viral, pensa-se que assume importância na fusão de membranas citoplasmáticas, pela interação com a proteína F (Valarcher & Taylor, 2007).

As proteínas não estruturais 1 e 2 interagem com o INF- α e INF- β , bloqueando a ação da resposta imunitária, que permite ao vírus a sua sobrevivência (Valarcher & Taylor, 2007).

A matriz do vírus apresenta três proteínas importantes na regulação da transcrição do vírus, organização da molécula de RNA e na construção da partícula viral. As proteínas N, L e P (nucleoproteína, proteína da polimerase e fosfoproteína, respetivamente) desempenham a função de transcrição do RNA viral, pela sua valência enquanto cofatores das polimerases e constituem a nucleocápside (Guzman & Taylor, 2015).

O contacto com secreções nasais e a exposição a aerossóis contaminados com partículas virais constituem as principais vias de transmissão do agente. O vírus replica-se no epitélio ciliado e não ciliado das vias aéreas e no parênquima pulmonar (Ellis, 2009), maioritariamente nos pneumócitos tipo II, presentes nos alvéolos pulmonares (Valarcher & Taylor, 2007). Desta forma, a infecção pelo BRSV predispõe para a infecção por bactérias

comensais do trato respiratório bovino, pelo que é um agente etiológico no CRB (Sacco *et al.*, 2014). Ocorre a destruição de células do aparelho muco-ciliar, o que favorece o crescimento microbiano pela incapacidade de limpeza fisiológica do pulmão, através da expulsão de muco (Fenner *et al.*, 2010b).

O BRSV provoca a libertação de imunoglobulina G ao nível pulmonar e a ativação de macrófagos (Sacco, *et al.*, 2014) como resultado de uma resposta pro-inflamatória exuberante, mediada por citocinas e quimiocinas (Guzman & Taylor, 2015). A libertação de muco e a descamação celular exuberante conduzem a enfisema e atelectasia pulmonar, assim como a obstrução bronquiolar (Hägglund & Valarcher, 2016).

O vírus tem um período de incubação de dois a cinco dias (Valarcher & Taylor, 2007) e a infeção pode ser assintomática e limitar-se ao trato respiratório superior, ou incidir o trato respiratório inferior. Uma vez mais, os sinais clínicos surgem associados à proliferação e infeção bacteriana secundária (Ellis, 2009). As manifestações clínicas mais exuberantes são resultado da pneumonia intersticial viral, provocada pelo BRSV e surgem com maior frequência em efetivos bovinos seronegativos. Quando o vírus é endémico da exploração, a pneumonia intersticial viral ocorre de forma esporádica e as manifestações de doença surgem associadas à DRB (Luzzago *et al.*, 2010). Caracterizam-se por febre, aumento da frequência respiratória, corrimento nasal sero-mucoso, tosse e a auscultação pulmonar é sugestiva de broncopneumonia e bronquiolite (Valarcher & Taylor, 2007).

Em bovinos leiteiros regista-se uma diminuição vincada na produção de leite e está descrito o enfisema subcutâneo como sinal clínico da pneumonia intersticial viral (Stilwell, 2013). Em machos pode ocorrer a fibrose testicular, em que o principal sinal clínico é a diminuição da motilidade espermática (Brodersen, 2010).

A proteção conferida pelos anticorpos maternos, presentes no colostro, é relativa, uma vez que estudos indicam que a proteção não é total e a doença pode manifestar-se (Gershwin, 2012).

O isolamento do vírus para diagnóstico de infeção por BRSV é difícil uma vez que o vírus está frequentemente ligado a anticorpos produzidos pelo hospedeiro no momento da recolha de amostras e o período de excreção é curto. O vírus pode ser identificado por imunofluorescência em lavagens broncoalveolares e traqueais e amostras recolhidas em necropsia. Por serologia, o diagnóstico carece de amostras emparelhadas, com o aumento significativo do título de anticorpos entre a fase aguda da doença e após duas a quatro semanas (Hägglund & Valarcher, 2016). As técnicas de PCR reúnem como principal desvantagem a possibilidade de interferir com as partículas virais das vacinas vivas atenuadas (Fenner *et al.*, 2010b), porém, são as técnicas que reúnem melhor especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de BRSV (Hägglund & Valarcher, 2016).

Em explorações situadas em zonas endémicas de BRSV é difícil quantificar a incidência da doença provocada pelo agente uma vez que a resposta humoral é persistente e a prevalência é alta (Luzzago *et al.*, 2010). Por se tratar de um agente endémico na Europa e os mecanismos de resistência e permanência nos efetivos não estarem completamente esclarecidos, o controlo da doença respiratória provocada pelo BRSV passa maioritariamente pela vacinação, ainda que o vírus circule entre animais vacinados. Existem no mercado várias vacinas para o BRSV como as vacinas vivas atenuadas ou vacinas inativadas, para administração via nasal ou parenteral, pelo que é de se considerar o facto de algumas preparações vacinais resultarem na manifestação clínica exuberante de pneumonia intersticial bovina. Atualmente, sabe-se que estas vacinas não são totalmente eficazes, pelo que carecem de maior investigação (Ellis, 2017).

3.2.3.2. Vírus da parainfluenza tipo 3

Em 1959 fez-se o primeiro isolamento do vírus Pi-3, nos Estados Unidos da América, a partir de amostras recolhidas de bovinos que manifestavam doença respiratória associada ao transporte (Ellis, 2010).

Este vírus pertence à família *Paramyxoviridae*, género *Respirovirus*. Estruturalmente é bastante similar ao BRSV, constituído por uma cadeia simples de RNA negativo, uma cápside e por um envelope que expressa duas glicoproteínas responsáveis pela adesão e entrada do vírus na célula hospedeira – glicoproteínas HM e F (Takimoto & Portner, 2004).

Adicionalmente às proteínas anteriormente mencionadas, a molécula de RNA codifica outras sete proteínas. As proteínas estruturais são a proteína de matriz, proteína M, presente na face interna do envelope e que tem a função de construção e libertação das novas partículas virais, assim como as proteínas que constituem a nucleocápside: N, P e L, sendo que as duas últimas estão intimamente relacionadas com o mecanismo de replicação viral por abrangerem a RNA-polimerase viral (Takimoto & Portner, 2004; Ellis, 2010). As proteínas C, D e V são proteínas não estruturais e pensa-se que a sua função está associada ao bloqueio da ligação do INF às células infetadas (Ellis, 2010). Deste modo, a infeção pelo vírus provoca a destruição do epitélio ciliado e a supressão da resposta imunitária celular, o que predispõe para as infeções secundárias bacterianas (Gray *et al.*, 2017).

A maioria das infeções por Pi-3 é subclínica, pelo que o vírus surge maioritariamente associado como agente etiológico da DRB (Neill *et al.*, 2015). Nas infeções agudas, os principais sinais clínicos são a tosse, o corrimento nasal e febre (Neill *et al.*, 2015). Alguns animais podem manifestar diarreia, dispneia, diminuição do apetite e corrimento ocular (Veljović *et al.*, 2016).

O teste *gold standard* para diagnóstico laboratorial do agente é o isolamento seguido do teste de neutralização. Os métodos serológicos centram-se nas provas de hemaglutinação, imunofluorescência direta e indireta, assim como as provas ELISA e os métodos moleculares

como o PCR e o PCR em tempo real (*real time Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction* – RTq-PCR) podem ser aplicados para diagnóstico da infecção pelo vírus (Veljović *et al.*, 2016). Os testes ELISA não permitem distinguir os animais infetados dos animais vacinados e o isolamento do vírus, assim como a imunohistoquímica, quando aplicados em amostras de animais vivos, não permitem estabelecer o diagnóstico de infecção, pelo que não é possível associar a presença do vírus às lesões dos tecidos (Gray *et al.*, 2017).

As vacinas disponíveis, tanto para administração parenteral como para administração intranasal, são vacinas vidas atenuadas ou vacinas inativadas (Ellis, 2010).

3.3. Diarreia viral bovina

3.3.1. Etiologia

O BVDV é um pestivirus da família *Flaviridae*. Por se encontrar disseminado por todo o mundo, é considerado um agente endémico em muitos países (Peterhans *et al.*, 2010). Para além de ser o agente da diarreia viral bovina, a infecção por este vírus está associada à doença respiratória bovina.

São conhecidos três genótipos (genótipo tipo 1, tipo 2 e genótipo tipo 3) e dois biótipos entre cada genótipo: o biótipo citopático, que induz efeitos citopáticos na célula hospedeira e o biótipo não-citopático, capaz de produzir infecção persistente sem causar lesão celular (Maclachlan & Dubovi, 2010; Benevides *et al.*, 2015). As técnicas moleculares recentes permitem identificar 12 subtipos de BVDV tipo 1 e três subtipos do BVDV tipo 2 (Benevides *et al.*, 2015). Ambos os genótipos 1 e 2 foram isolados a partir de amostras recolhidas de animais em Portugal, sendo o tipo 1b o que regista maior prevalência (Barros *et al.*, 2006). No arquipélago dos Açores foram identificados os genótipos 1 e 2, sendo que na ilha de São Miguel o genótipo 1 subtipos 1b, 1d e 1e são os mais prevalentes (Benevides *et al.*, 2015).

Para além do mecanismo de replicação não-citopático, o facto de se manter no genoma do hospedeiro e a capacidade de bloquear a resposta imune permite ao BVDV produzir quadros de infecção persistente (Brock, 2003; Tautz *et al.*, 2015). Independentemente do genótipo, dos fatores de virulência e das propriedades antigénicas que a partícula viral possa reunir, todos os vírus do BVD do biótipo não-citopático possuem a capacidade de provocar infecção persistente, sendo que a variedade das estirpes manifesta-se pelos sinais clínicos que provocam (Peterhans & Schweizer, 2013).

A partícula viral é constituída por RNA genómico, uma cápside constituída por proteínas e um envelope lipídico com glicoproteínas codificadas pelo genoma viral (Neill, 2013). A glicoproteína E^{ms} além de ser estrutural, possui atividade RNase, permitindo limitar a resposta imune inata do hospedeiro, uma vez que as cadeias duplas de RNA são indicadores de infecção viral (Mätzener *et al.*, 2009). As glicoproteínas E1 e E2 são exclusivamente proteínas de

membrana. A E2 contém o maior número de determinantes antigénicos da partícula viral, pelo que a resposta humoral é direcionada a esta glicoproteína (Deregt *et al.*, 1998 referido por Neill, 2013).

A proteína não estrutural N^{pro}, exclusiva dos pestivirus, tem a capacidade de bloquear a síntese de INF, através da degradação proteossomal do fator regulador do INF-3, produzido pela célula hospedeira quando infetada (Hilton *et al.*, 2006). Por sua vez, a proteína p7 está envolvida na formação de canais iónicos na membrana celular, o que facilita a infeção célula-a-célula (Griffin *et al.*, 2004, referido por Neill, 2013).

Após tradução da proteína p7, traduzem-se as proteínas NS2 e NS3. Em células infetadas por biótipos não-citopáticos a proteína encontra-se sobre a forma NS2-3, considerada não processada (Neill, 2013). Sabe-se que o complexo NS2-3 é um fator determinante da morfologia do vírus, bem como na síntese de partículas virais e que em quadros de infeção latente permite ao vírus manter-se no hospedeiro sem manifestação clínica aparente e consequente diminuição ou ausência da excreção viral (Klemens *et al.*, 2015). Quando há infeção pelo biótipo citopático, ocorre a clivagem da proteína em NS2 e NS3 e consequente ativação de enzimas fundamentais ao mecanismo de replicação viral (Neill, 2013) e indução da apoptose celular.

As proteínas NS4A, NS4B, NS5A e NS5B atuam como co-fatores da atividade da proteína NS3, sendo estas necessárias aos mecanismos de replicação viral, através da ativação da RNA-replicase. Outras funções destas proteínas são desconhecidas (Klemens *et al.*, 2015).

3.3.2. Epidemiologia e transmissão

A epidemiologia e transmissão do agente está fortemente dependente da presença de animais persistentemente infetados (PI) nas explorações. Estes animais são infetados antes do nascimento e não desenvolvem resposta imunitária para o vírus, pelo que excretam grandes quantidades de partículas virais para o meio ambiente sem que manifestem sinais clínicos exuberantes (Ridpath, 2010), o que justifica a importância da transmissão vertical para a persistência do vírus. Assim, a transmissão do BVDV ocorre maioritariamente pela presença destes animais na exploração, através do contacto direto, venéreo, por aerossóis e secreções corporais. Os animais com infeções agudas também excretam o agente e podem contaminar outros animais pelas mesmas vias. Está descrita a transmissão do vírus por vetores biológicos, utilização de equipamentos contaminados e pela sua presença no meio ambiente quando as condições de higiene são reduzidas (Niskanen & Lindberg, 2004).

3.3.3. Patogenia

A patogenia deste vírus é complexa e está dependente do mecanismo pelo qual ocorreu a transmissão do agente. Relativamente à transmissão horizontal, após a entrada do agente ocorre uma infeção transitória à qual o animal direciona uma resposta imunitária (Thulke *et al.*, 2017) que conduz à produção de anticorpos neutralizantes (Brodersen, 2014). Por sua vez, a dinâmica pela qual o vírus estabelece a infeção persistente é característica dos pestivirus (Tautz *et al.*, 2015). A compreensão destes mecanismos de infeção do vírus são fundamentais para o reconhecimento dos diferentes quadros clínicos, uma vez que estes estão dependentes da estirpe viral e principalmente do animal ser ou não um animal PI.

3.3.3.1. Animais persistentemente infetados (PI)

A infeção durante a gestação resulta num quadro bastante variado de apresentações clínicas, dependentes da fase da gestação em que ocorre o contacto com o vírus (Ridpath, 2010). Em fêmeas que estabelecem o primeiro contacto com o agente durante a gestação, o vírus estabelece uma infeção transplacentária (Newcomer & Givens, 2016). Quando a fêmea é infetada pelo vírus durante os primeiros 45 dias de gestação ocorre morte embrionária devido a endometrite e conseqüente infeção do embrião (Newcomer & Givens, 2016). O aumento das prostaglandinas durante a infeção por BVDV provoca a lise do corpo lúteo, necessário para a manutenção da gestação (Brodersen, 2014).

No período entre os três e os cinco meses de gestação, a infeção manifesta-se pelos defeitos congénitos dos vitelos, a nível do sistema nervoso central, como a microcefalia, hipoplasia do cerebelo ou hidrocéfalo, a nível ótico, com a formação de cataratas, degeneração da retina ou microftalmia e, a nível do sistema imunitário, pela atrofia do timo. Surgem também alterações da pele e do pelo, defeitos musculoesqueléticos e hipoplasia pulmonar (Kelling & Topliff, 2013). Ainda que a infeção possa resultar no nascimento de vitelos fracos, o aborto, mumificação e a reabsorção fetal são os efeitos mais comuns da infeção (Ridpath, 2010).

O aborto pode ocorrer em qualquer fase da gestação, tal como na figura 10, ocorreu durante o terceiro trimestre de gestação. Quando se pretende obter um diagnóstico, deve-se descartar outras infeções que podem conduzir ao aborto.

Quando ocorre a infeção por BVDV biótipo não-citopático, entre os 40 e os 125 dias de gestação, pode-se estabelecer a infeção persistente dos vitelos. Estes vitelos não têm a capacidade de reconhecer o vírus como um agente patogénico. Para que se estabeleça a condição de animal persistentemente infetado é necessário que o sistema imunitário do vitelo não esteja desenvolvido na sua totalidade (Brodersen, 2014). A patogenia da infeção durante a gestação resume-se pela figura 11.



Figura 10: Feto abortado por novilha com serologia positiva para a pesquisa de anticorpos para BVDV e serologia negativa para *Neospora caninum*.

Peterhans e Schweizer (2013) definem o biótipo citopático como um erro genético que se manifestou pela evolução do vírus, na medida em que ao infectar os animais PI ocorre a morte do hospedeiro. Comparativamente com o biótipo não-citopático, que tem a capacidade de desenvolver a infecção persistente e assegurar a manutenção e transmissão do vírus nos efetivos bovinos, o biótipo citopático quase que pode ser classificado como auto-limitante (Peterhans & Schweizer, 2013).

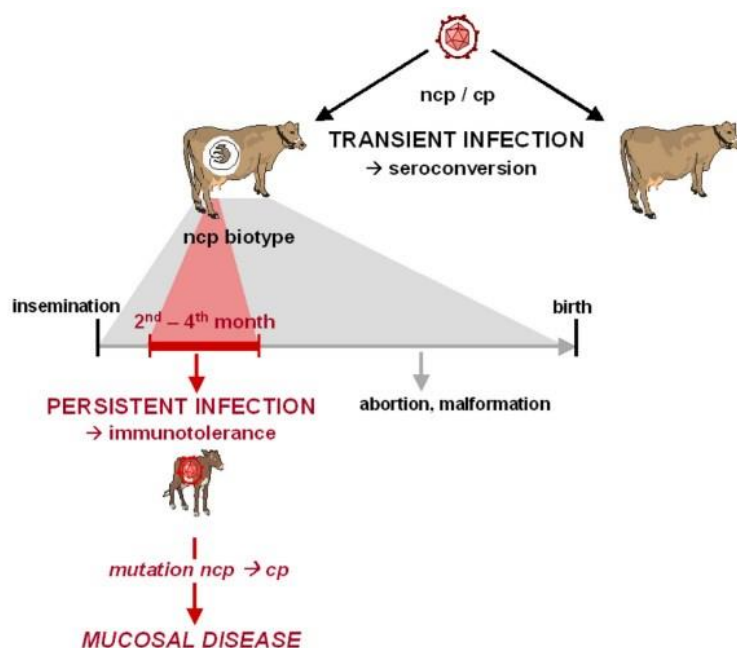


Figura 11: Representação esquemática das repercussões para o vitelo pela infecção por BVDV durante a gestação (Peterhans et al., 2013).

O fígado assume um papel importante na imunidade do feto, na medida em que é este o órgão onde se inicia a circulação fetal, após entrada do sangue pela veia umbilical. Assume a hematopoiese e o desenvolvimento da imunidade pela ativação dos linfócitos T. As células de *Kupffer* são macrófagos presentes no tecido hepático que desenvolvem tolerância ao BVDV, pelo

que a libertação de citocinas inflamatórias como resposta à infecção viral é mínima. Deste modo, o sistema imunitário não desenvolve uma resposta eficaz para a presença do vírus no organismo (Chase *et al.*, 2015).

O BVDV replica-se maioritariamente nos linfócitos, o que altera a resposta imunitária dos animais PI. Como principal consequência, a disfunção que provoca no sistema imunitário faz com que estes animais sejam suscetíveis a infeções secundárias (Kelling & Topliff, 2013).

A replicação viral pode ocorrer nas células do sistema nervoso central. Estudos no isolamento e identificação do vírus a nível do encéfalo indicam que a presença do vírus nas áreas cerebrais relacionadas com o crescimento, reprodução e resposta imunitária afetam a longevidade dos animais PI (Kelling & Topliff, 2013).

Os animais PI são excretores do vírus e consideram-se a principal fonte de infecção nas explorações. Estes animais, que estão em virémia permanente, são mais fracos e muitas vezes não vivem além do primeiro ano de vida (Laureyns *et al.*, 2010; Newcomer & Givens, 2016). As vacas PI que atingem a idade adulta e estabelecem gestação originam sempre vitelos PI (Kelling & Topliff, 2013), ainda que a percentagem de animais a atingir a idade adulta seja muito reduzida (Lanyon *et al.*, 2014).

Quando a infecção da fêmea gestante ocorre no último terço da gestação, o vitelo já é imunocompetente pelo que pode produzir uma resposta imunitária eficiente para o vírus. Deste modo, nasce com anticorpos contra o BVDV e sem manifestações teratogénicas da infecção pelo mesmo (Lanyon *et al.*, 2014).

A infecção pelo BVDV pode ser crónica em animais que não são PI. Estas infeções estabelecem-se em tecidos onde a resposta imunitária é naturalmente suprimível, ou seja, ao nível dos tubos seminíferos, folículos ovários e no sistema nervoso central. Pela infecção dos leucócitos, o BVDV pode permanecer em circulação e prolongar a infecção (Givens & Marley, 2013).

3.3.4. Manifestação clínica

A manifestação clínica das infeções por BVDV está dependente do genótipo e biótipo do vírus, da resposta imunitária, idade e estado reprodutivo do hospedeiro, bem como da existência de infeções concomitantes. As formas respiratórias e reprodutivas são as mais frequentes (Ridpath, 2010).

Sabe-se que o BVDV é responsável por imunossupressão, o que determina o envolvimento secundário de outros agentes e a manifestação clínica da infecção. Por exemplo, existe efeito sinérgico com o BoHV-1, BRSV e com *Mannheimia haemolytica*, no trato respiratório

e com rotavírus, coronavírus, *E coli* e *Salmonella sp*, presentes no trato digestivo (Bolin & Grooms, 2004).

3.3.4.1. Infecção subclínica

A infecção subclínica ocorre na maioria das infecções de bovinos adultos, sendo que alguns autores referem taxas de 90% de infecções subclínicas (Grooms *et al.*, 2009). O único sinal clínico pode ser a febre, que muitas vezes não é reconhecida. Há leucopenia e o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes para o vírus (Grooms *et al.*, 2009). A principal manifestação da infecção pelo vírus pode ser a DRB em explorações de engorda e explorações leiteiras, maioritariamente quando o agente é endêmico (Mosier, 2015).

3.3.4.2. Infecção aguda

É definida como a infecção pelo vírus que ocorre nos animais imunocompetentes e que não são PI (Ridpath, 2010) e caracteriza-se por uma virémia transitória, a partir do terceiro dia após infecção, que tem a duração de duas semanas, aproximadamente (Lanyon *et al.*, 2014).

A morbidade e mortalidade das infecções agudas por BVDV em animais imunocompetentes é relativamente baixa, sendo que se verifica um aumento da incidência quando há infecção de efetivos seronegativos. Esta infecção manifesta-se em bovinos de todas as idades, sendo que em vitelos as manifestações são mais severas (Van Metre *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos são a febre, diarreia, depressão, anorexia, formação de úlceras e erosões na mucosa oral, corrimento nasal e ocular e quebra na produção de leite (Grooms *et al.*, 2009). As erosões a nível da mucosa oral surgem apenas em 30% a 50% dos casos. Caracterizam-se pela hiperémia das mucosas e erosões ao nível das papilas, das gengivas, do palato mole e duro, maioritariamente. Estão descritas lesões digitais, ainda que pouco frequentes em animais adultos, caracterizadas pela hiperémia do bordo coronário, exsudação e lesões interdigitais (Van Metre *et al.*, 2008). A diarreia pode ser mucosa ou aquosa, profusa e sanguinolenta, sendo que o aspeto é determinado pela estirpe viral envolvida. À necropsia podem ser visíveis lesões a nível da mucosa do trato gastrointestinal (Van Metre *et al.*, 2008). Tal como na infecção subclínica, ocorre imunossupressão com uma leucopénia marcada. Observou-se que esta depleção de leucócitos – células T e células B, ocorre pela indução da apoptose promovida pelas citocinas libertadas pelos macrófagos e células dendríticas (Chase *et al.*, 2015).

3.3.4.3. Síndrome hemorrágica

A síndrome hemorrágica é desencadeada pela infecção aguda pelo BVDV tipo 2, em que ocorre trombocitopenia severa, ainda que se desconheçam os mecanismos pelos quais o vírus provoca a disfunção plaquetária (Caldow, 2009; Grooms *et al.*, 2009), que resulta em diarreia sanguinolenta, epistaxis, hemorragia das mucosas e hifema. Os animais entram em choque hipovolêmico, com conseqüente hipotermia e morte (Bolin & Grooms, 2004).

A síndrome hemorrágica surge maioritariamente associada a surtos, em que há a entrada do BVDV tipo 2 numa exploração ou grupo de animais (Bolin & Grooms, 2004). Alguns autores sugerem que estirpes de BVDV tipo 1 podem estar envolvidas em quadros de síndrome hemorrágica (Caldow, 2009).

3.3.4.4. Doença das mucosas

Manifestação clínica exclusiva dos animais PI, a doença das mucosas (*mucosal disease* - MD) resulta da infecção por biótipos citopáticos dos animais PI. Os antígenos do biótipo citopático e do não-citopático são homólogos (Weber *et al.*, 2016) pelo que não existe uma resposta imunitária para o biótipo citopático.

Enquanto ocorre replicação do vírus, a presença de RNA induz a apoptose por diversas vias: pela produção da proteína NS3, pela libertação de citocromo c pelas mitocôndrias, que constitui um fator ativador de protease, pelo TNF- α , pela atividade das citoquinas. Como o vírus tem tropismo para os tecidos linfoides, é nas placas de *Peyer* que ocorre a atrofia e depleção do tecido linfoide. Há destruição das microvilosidades intestinais e o órgão adquire um aspeto necrosado (Pedrera *et al.*, 2012; Lanyon *et al.*, 2014).

A MD manifesta-se apenas num único animal, ainda que possam ocorrer surtos associados à infecção de vacas na mesma fase de gestação. Caracteriza-se pela perda de peso e pelos quadros de diarreia profusa. Estão descritas lesões a nível das mucosas, com ulceração e erosão da mucosa oral, nasal, língua e esófago (Laven, 2008). A necrose dos queratinócitos do estrato espinhoso leva à degradação do epitélio queratinizado, que é causa das lesões a nível da mucosa oral, esófago, rúmen e retículo, bem como lesões cutâneas (Bielefeldt-Ohmann, 1995 citado por Lanyon *et al.*, 2014).

3.3.4.5. Manifestações reprodutivas

A infecção aguda pode resultar em falhas de concepção, na medida em que a infecção tem impacto ao nível do ovário e oócitos, sendo que nos machos pode ter efeitos negativos a nível dos testículos e espermatozoides. Após o período de virémia, os machos podem sofrer de diminuição da fertilidade durante alguns meses (Caldow, 2009). Está descrita a infertilidade em

fêmeas infetadas por BVDV (Grooms *et al.*, 2009). Pode ocorrer o recrudescimento de infeções por *Neospora caninum* em vacas com infeção aguda por BVDV (Quinn *et al.*, 2004, referido por Lanyon *et al.*, 2014).

3.3.5. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial do BVDV pode assentar no isolamento do vírus em cultura de células, a partir de amostras de sangue, corrimento nasal, tecidos de fetos abortados ou tecidos recolhidos em necropsia. A deteção de antigénio em tecidos infetados, com recurso a imunofluorescência ou imunohistoquímica é particularmente útil no diagnóstico de animais persistentemente infetados, uma vez que estes animais não desenvolvem resposta imune à infeção viral. A deteção de RNA viral, pela técnica de RT-PCR de amostras de sangue ou tecido infetado e serologia são também outros métodos de diagnóstico (Maclachlan & Dubovi, 2010).

O diagnóstico por serologia, deteção de anticorpos para a proteína p80, perde a sua validade quando aplicado a amostras de animais vacinados para o agente. A deteção de anticorpos é um indicador de contacto com o agente, pelo que não pode ser utilizado como diagnóstico definitivo de infeção. Em animais com anticorpos maternos em circulação, o resultado serológico positivo a esta prova laboratorial deve ser descartado (Dubovi, 2013).

Quando aplicado a amostras do tanque de leite, a pesquisa de anticorpos apenas permite aferir a suscetibilidade do efetivo em lactação a uma infeção por BVDV. Este teste é útil na monitorização da exploração quando se realizam programas de controlo do agente (Laven, 2008).

Para diagnóstico dos animais PI, a pesquisa de antigénio pelo método ELISA permite detetar quantidades de vírus muito superiores nestes animais do que seria esperado num animal infetado que não é PI. A amostra emparelhada, com um intervalo de três semanas permite estabelecer o diagnóstico de PI uma vez que não existe qualquer seroconversão nestes animais e há manutenção de grandes quantidades de vírus em circulação (Laven, 2008) O vírus está presente em grandes quantidades nos linfonodos e timo, cérebro e nas células epiteliais e linfoides do intestino, pelo que estes tecidos podem ser úteis no diagnóstico *post-mortem* (Pedrera *et al.*, 2012).

3.3.6. Controlo e erradicação

Os países nórdicos da Europa conseguiram controlar e até mesmo erradicar o BVDV pela aplicação de estratégias em que a vacinação não estava incluída nos protocolos (Moening & Becher, 2018). De um modo geral, estas estratégias assentam na identificação de animais PI e na avaliação do estatuto das explorações com recurso a provas laboratoriais e posterior decisão sobre o abate dos animais infetados (Lindberg *et al.*, 2005). A identificação de animais

PI pode ser efetuada pela análise imunohistoquímica de uma amostra de tecido, como por exemplo pele da orelha (Laven, 2008), uma vez que estes animais não produzem anticorpos para o vírus. As técnicas moleculares, como o PCR, permitem identificar a presença de RNA do vírus (Grooms *et al.*, 2009). O estatuto sanitário de cada animal pode ser determinado pela deteção de anticorpos, quando os animais não são vacinados. Consoante o resultado serológico, pode-se decidir o futuro reprodutivo do animal, uma vez que a infeção de animais durante a gestação pode resultar em vitelos PI (Lindberg *et al.*, 2005).

Outras estratégias afirmam que a serologia no leite do tanque e em amostras de sangue de animais suspeitos permite identificar a presença do vírus na exploração, seguindo-se a pesquisa e identificação dos animais PI na exploração. Segue-se a implementação de medidas de eliminação dos animais infetados e a execução de planos de controlo serológico das explorações. Com a eliminação dos animais PI as pressões de infeção reduzem de forma drástica e naturalmente aumenta o número de animais seronegativos para o vírus (Moenning & Becher, 2018).

Lindberg e colegas (2006), definem como pilares para a implementação de um programa de controlo do BVDV os seguintes pontos:

1. Biossegurança, pelo controlo da entrada de animais nas explorações (animais PI, fêmeas gestantes e machos reprodutores constituem fatores de risco para a manutenção e entrada do agente) e pelo contacto com animais de outras explorações;
2. Identificação e eliminação dos animais PI da exploração;
3. Vigilância epidemiológica, assente nas provas laboratoriais para deteção de novas infeções e monitorização das explorações livres do agente.

A vacinação deve ser tomada em consideração sempre que a densidade animal e a prevalência do agente são elevadas. Nos programas de controlo e erradicação voluntários, a vacinação é ainda mais importante, uma vez que permite aumentar a imunidade do efetivo para o agente – constitui uma medida de biossegurança que dificulta a entrada do agente na exploração (Lindberg *et al.*, 2006).

Importa referir que as estratégias de controlo e erradicação dos agentes sem recurso a vacinação requerem uma prevalência de animais infetados relativamente baixa (Lindberg *et al.*, 2006). Depreende-se que as estratégias de controlo e erradicação que englobam a vacinação devem ser direcionadas a explorações e países em que o agente é endémico e está largamente distribuído pelos efetivos bovinos (Moenning & Becher, 2018), assim como nas situações em que os programas de controlo e erradicação dos agentes são voluntários (Lindberg *et al.*, 2006).

Os principais objetivos dos programas de vacinação são a prevenção do aparecimento de animais PI, assim como a redução dos casos de doença aguda e manifestações reprodutivas

da infeção pelo BVDV (Newcomer *et al.*, 2017). Atualmente, a maioria das vacinas vivas atenuadas são produzidas a partir do biótipo citopático do vírus. Como os biótipos citopáticos não conseguem estabelecer a infeção persistente nos vitelos, estas vacinas conferem a proteção fetal, aspeto descurado por muitas das restantes vacinas disponíveis, e promovem uma imunidade humoral e celular consistente (Moening & Becher, 2018).

Independentemente das estratégias para a deteção de animais PI e posterior eliminação, bem como das estratégias assumidas pelo plano de controlo e erradicação que se estabelecem, observa-se o sucesso nas medidas tomadas na maioria dos países europeus. Deste modo, conclui-se que o rigor e a aplicação sistemática das estratégias definidas constituem o principal fator que contribui para os bons resultados dos planos elaborados (Thulke *et al.*, 2017).

Nos Açores, a portaria nº 56/2016 de 21 de junho estabelece as normas do plano de controlo do BVDV. Este programa destina-se aos produtores de bovinos com marca de exploração no território da Região Autónoma dos Açores. Nem todas as explorações estão abrangidas pelo plano de controlo do BVDV neste momento. As explorações abrangidas devem rastrear todos os animais no momento da colheita de sangue para as provas referentes aos planos de controlo e erradicação da brucelose e tuberculose. Após deteção de animais PI, os produtores devem proceder ao abate dos animais, que é participado financeiramente pelo Governo.

Os produtores abrangidos pelo programa devem também proceder à identificação dos animais nascidos na exploração com brincos de ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid – DNA) para que se faça o rastreio de animais PI. Caso existam animais positivos, o processo é igual ao anteriormente descrito.

Relativamente à vacinação, o plano de controlo do BVDV nos Açores apenas recomenda a vacinação dos efetivos, sendo que a vacina utilizada e o protocolo de vacinação ficam ao critério do produtor e médico veterinário assistente da exploração.

A portaria nº 29/2018 de 27 de março, vem adicionar à portaria indicada anteriormente a pesquisa de antígeno de BVDV para todos os animais que entrem nas explorações sob o plano de controlo, pelo que o resultado serológico tem de ser negativo.

3.4. Rinotraqueíte infecciosa bovina

3.4.1. Etiologia

O vírus da IBR, denominado por BoHV-1 é um agente patogénico dos bovinos com uma distribuição mundial (Beer, 2012), identificado pela primeira vez em 1953 como agente da IBR nos Estados Unidos da América (Yales, 1982, referido por Raaperi *et al.*, 2014).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae* e subfamília *Alphaherpesviridae*. Os herpesvírus possuem uma cápside icosaédrica e um envelope de lipoproteínas derivadas de células hospedeiras, unido à cápside por proteínas codificadas pelo vírus e que constituem o tegumento. A subfamília do BoHV-1 caracteriza-se por ter um curto ciclo de replicação e pela capacidade de induzir infecção latente, maioritariamente a nível de células neuronais (Muylkens *et al.*, 2007).

São conhecidos vários subtipos de BoHV-1: o BoHV-1.1, associado a doença respiratória e aborto, BoHV-1.2a a doença respiratória e reprodutiva, sendo que ocorre a vulvovaginite postular infecciosa (IPV) nas fêmeas e a balanopostite infecciosa (IBP) nos machos, BoHV-1.2b as mesmas manifestações clínicas, mas menor virulência que a estirpe anterior e BoHV-1.3, associado a encefalites e outras doenças encefálicas (Muylkens *et al.*, 2007; Chase *et al.*, 2017).

O genoma viral é constituído por duas sequências de DNA de cadeia dupla: a *unique long* (UL) e a *unique short* (US). Na UL estão codificadas as proteínas de membrana e glicoproteínas importantes para a interação do vírus com as células hospedeiras. No total, são conhecidas seis glicoproteínas codificadas na UL e quatro US (Muylkens *et al.*, 2007). O genoma viral reúne um total de 73 fases de leitura aberta (ORF – *open reading frames*), locais de transcrição que podem codificar proteínas fundamentais ao mecanismo de sobrevivência do vírus. Como exemplos, o tegumento é codificado pela UL49 e US9, as proteínas de regulação pela US3 e a UL49.5 codifica a glicoproteína N (gN) (Robinson *et al.*, 2008). As glicoproteínas B e C estão associadas à adesão do vírus à célula hospedeira e, juntamente com as glicoproteínas D, E, H, K e L, pela entrada na célula e pela infecção célula-a-célula (Biswas *et al.*, 2013).

A glicoproteína M inibe a actividade da TAP (TAP – *transporter-associated with antigen presentation*) e conseqüentemente a síntese de péptidos do complexo maior de histocompatibilidade classe I (*Major Histocompatibility Complex class I* - MHC-I). A gN promove a degradação proteossomal da TAP (Jones & Chowdhury, 2010).

O vírus do IBR codifica a glicoproteína G que é secretada pelas células infetadas e tem a capacidade se ligar a quimiocinas, bloqueando a sua atividade e ligação a recetores específicos. Deste modo, o recrutamento e a atividade dos linfócitos ficam comprometidos e o vírus sobrevive na célula infetada (Jones & Chowdhury, 2010).

Em resposta às infeções virais, as células produzem INF- α e INF- β enquanto os linfócitos T e as células *natural killer* libertam INF- γ nas células infetadas, de modo a promover a apoptose e circunscrever a infeção. Porém, todos os promotores virais são ativados pela proteína bICP0. Esta proteína consegue bloquear a sinalização do INF pela redução da expressão ou da atividade dos fatores reguladores do interferão 3 e 7. A bICP0 também induz a degradação de proteínas supressoras de tumores, que são antivirais presentes no núcleo das células (Arfoz *et al.*, 2016;

Jones, 2016). Importa referir que esta é a principal proteína reguladora da transcrição do genoma do vírus, com dois domínios de ativação da transcrição (Jones & Chowdhury, 2010).

Vp8 é a proteína mais abundante no tegumento e tem capacidade de bloquear a sinalização do interferão (Arfoz *et al.*, 2016). O gene UL41 codifica a proteína VHS (vhs – virion host shutoff), que bloqueia a ação do MHC-II e reduz a apresentação do antígeno às células de defesa (Ellis, 2009).

Por último, o gene relacionado com a latência (LR-RNA – Latency-related gene) codifica dois micro-RNA e mais de uma proteína, fundamentais para o estabelecimento da latência nas células nervosas (Jones, 2016). O mecanismo que estabelece a latência do vírus inclui a inibição da apoptose celular, pelo que a transcrição se foca única e exclusivamente neste gene (Winkler *et al.*, 2002). Este gene é constituído pela ORF1 e ORF2, sendo que a ORF2 codifica um conjunto de proteínas associadas ao mecanismo de reativação do vírus (Jones, 2013).

3.4.2. Epidemiologia e transmissão

A transmissão dentro da exploração pode ocorrer por contacto direto entre animais, aerossóis, por via venérea e através da inseminação artificial, com o uso de sémen de touros infetados (Chase *et al.*, 2017). Alguns autores referem a transmissão por vetores, como as carraças, possível (Levings & Roth, 2013a).

O período de excreção tem a duração média de 10 dias após a infeção (Levings & Roth, 2013a). A partícula viral consegue sobreviver no meio ambiente até um mês, em temperaturas baixas e humidade relativa elevada o que associado às fomites e secreções de animais infetados estabelece a transmissão do agente dentro da exploração (Nettleton & Russell, 2017).

Em explorações endémicas para o BoHV-1 as prevalências podem atingir valores de 85%, sendo que a seroprevalência aproxima-se dos 50% devido ao baixo número de anticorpos em circulação nos animais com infeção latente (Woodbine *et al.*, 2009).

Em 2017, Nettleton & Russell estabeleceram os principais fatores de risco para a entrada do vírus numa exploração. Os sistemas intensivos aumentam o risco de transmissão do BoHV-1, pela maior proximidade dos animais e dos aspetos de ventilação e circulação do ar. Outros fatores de risco são a entrada de animais na exploração; o tamanho do efetivo, sendo que quanto maior o número de animais, maior a probabilidade de ocorrer infeção; o uso de cobrição natural, uma vez que a transmissão do vírus pode ocorrer por via venérea e os machos reprodutores podem ser animais adquiridos fora da exploração; a densidade de explorações agrícolas instaladas numa dada região; participação dos animais em feiras e exposições, uma vez que há saída e regresso à exploração; ausência de medidas de biossegurança para a entrada de visitantes às explorações (Nettleton & Russell, 2017).

3.4.3. Patogenia

A infecção do hospedeiro ocorre pela cavidade oral, nasal ou pela conjuntiva ocular (Winkler *et al.*, 2002). O vírus entra nas células epiteliais das vias aéreas superiores, num processo de três etapas: 1) ligação da gB e gC à superfície das células; 2) ligação da gD ao recetor celular nectina-1; 3) fusão do envelope com a membrana celular, por intermédio da ação das restantes glicoproteínas (Ellis, 2009). Dentro da célula, a partícula viral é transportada para o núcleo onde se inicia a replicação do DNA viral, a síntese de proteínas estruturais e a génese de cápsides. A formação de novas partículas virais é outro processo que ocorre em três etapas: 1) o DNA envolto na cápside forma um envelope a partir da membrana interna do núcleo; 2) a fusão com a membrana externa do núcleo permite que a partícula viral chegue ao citoplasma onde, 3) adquire o tegumento e o envelope secundário no complexo de Golgi (Ellis, 2009).

Após a replicação viral, ocorre o período de virémia em que há libertação de partículas virais com capacidade de infecção de animais suscetíveis. Neste momento, pode-se estabelecer a infecção latente. Ao migrar para os nervos periféricos e atingir o gânglio trigêmeo, o vírus inicia a replicação do gene LR-RNA que lhe permite estabelecer a latência. A transcrição do gene está associada à célula hospedeira, sendo que só ocorre em células nervosas e na quantidade suficiente para induzir a latência (Levings & Roth, 2013a; Jones, 2016). Para além do gânglio trigêmeo, o gânglio sacral é outro local frequente onde se estabelece a latência do vírus (Pritchard *et al.*, 2003).

Além do estabelecimento da latência, a replicação viral ao nível da mucosa epitelial provoca uma rinotraqueíte e a invasão sistémica pelo vírus resulta em conjuntivite, vulvovaginite e aborto, balanopostite e infeções sistémicas nos vitelos (Winkler *et al.*, 2002). Os vitelos que são infetados no período em que têm anticorpos maternos para o BoHV-1 em circulação podem estabelecer infeções latentes ainda que não manifestem qualquer sinal clínico de infecção (Geraghty *et al.*, 2012). Sabe-se que a resposta humoral do animal infetado com BoHV-1 é bastante efetiva na neutralização e eliminação do vírus a nível sistémico, pelo que se julga ser um aspeto para promover a latência da infecção (Caldow *et al.*, 2018).

A reativação do vírus latente pode ser induzida pela administração de glucocorticoides, como a dexametasona. O *stress* e outros fatores que promovam um aumento da concentração de glucocorticoides endógenos leva à reativação viral (Winkler *et al.*, 2002), pelo que o parto é considerado outro fator de reativação viral (Geraghty *et al.*, 2012). Quando há reativação do vírus, ocorre a excreção de partículas virais para o meio ambiente e outros animais podem ser infetados. As novas partículas virais podem restabelecer a latência da infecção nas células neuronais vizinhas (Jones, 2013). A frequência com que ocorre a reativação do vírus em animais com infecção latente é desconhecida, mas o facto de existirem animais com níveis de anticorpos inferiores aos detetáveis pelos métodos serológicos sugere que a reativação não ocorre com

grande frequência, mas o impacto das infecções subclínicas em explorações infetadas deverá ser maior do que o estimado (Geraghty *et al.*, 2012).

A mucosa dos animais infetados com BoHV-1 reúne imunoglobulina A e mediadores de células inflamatórias com capacidade de reconhecimento do vírus, que lhes confere proteção num novo contacto com o agente (Caldow *et al.*, 2018).

As manifestações reprodutivas do BoHV-1.2, a IPV e IBP, resultam maioritariamente da infeção por via venérea, pelo que podem ou não estar associadas à manifestação a nível respiratório típica da IBR. Esta forma de infeção manifesta-se com maior frequência nos animais mais jovens, sendo pouco frequente a partir da quarta lactação, em bovinos leiteiros (Nettleton & Russell, 2017), ainda que os sistemas de produção e manejo sejam determinantes para o momento em que ocorre a infeção. Por exemplo, em explorações leiteiras, quando os regimes de manejo que possibilitam a separação dos animais por idades e fase produtiva, constituindo-se o grupo das novilhas, o grupo de vacas em lactação e o grupo das vacas no período seco, é frequente as primeiras serem seronegativas e a fonte de infeção residir nos grupos onde existem animais adultos. Deste modo, as manifestações reprodutivas podem ser menos frequentes em animais jovens e a infeção destes animais coincidir com o início da produção leiteira (Graham, 2013).

3.4.4. Manifestação clínica

Numa primeira análise é importante considerar que a presença do vírus numa exploração não está diretamente relacionada com a manifestação da doença. Deste modo, existem explorações infetadas em que há ausência de sinais clínicos sugestivos da infeção pelo BoHV-1 (Pritchard *et al.*, 2003).

A severidade das infeções por BoHV-1 está dependente de vários fatores, nomeadamente a virulência do agente e o envolvimento bacteriano secundário, pelo que as infeções subclínicas são frequentes (Muylkens *et al.*, 2007). Quando não ocorre envolvimento bacteriano secundário, as lesões estão limitadas ao trato respiratório superior (Jones, 2016) e a doença é denominada por IBR. A infeção manifesta-se principalmente pela pneumonia bacteriana secundária. A infeção única pelo vírus caracteriza-se pela rinotraqueíte, com focos de necrose no epitélio, febre, anorexia e prostração, tosse e corrimento nasal purulento. A taquicardia e a taquipneia podem surgir secundariamente à dispneia. Os sinais oculares mais frequentes são a conjuntivite, com fotofobia consequente e o corrimento ocular. Surge a hiperémia, erosões e úlceras a nível da mucosa nasal (Muylkens *et al.*, 2007; Nettleton & Russell, 2017). As infeções sistémicas neonatais caracterizam-se pela encefalite e por lesões a nível hepático, renal, esplénico e nas glândulas adrenais, sendo menos frequente as lesões intestinais,

cardíacas e ruminais. À necropsia são observados focos de necrose com infiltração de células inflamatórias, como os neutrófilos e macrófagos (Moeller *et al.*, 2013).

Em animais adultos, o BoHV-1 manifesta-se maioritariamente como agente viral na DRB. O papel do vírus na DRB surge pelo aumento da suscetibilidade do hospedeiro à infeção bacteriana secundária. Com a redução da expressão do CMH-I e da TAP, não ocorre o reconhecimento de células infetadas por parte dos linfócitos T CD8+ e o vírus induz a apoptose dos linfócitos T CD4+ (Jones & Chowdhury, 2010).

O aborto ocorre em fêmeas seronegativas que são infetadas durante a gestação (Moeller *et al.*, 2013). A infeção pode afetar a fertilidade se ocorrer no período reprodutivo e a morte embrionária ocorre em infeções no início da gestação (Chase *et al.*, 2017). Ainda que experimentalmente a indução do aborto ocorra em qualquer fase do desenvolvimento embrionário e crescimento fetal, é mais frequente a na segunda metade da gestação. Os fetos abortados apresentam focos de necrose em vários órgãos e pode existir necrose e vasculite da placenta (Anderson, 2007).

Em 2015, Statham e colegas desenvolveram um estudo onde concluíram que a produção de leite é afetada pelas infeções subclínicas de BoHV-1 em valores próximos dos 1000Kg de leite por ano. Comparativamente a outros estudos, a variação na quebra de produção pode dever-se às diferentes estirpes do vírus, bem como a fatores inerentes a cada exploração (Statham *et al.*, 2015). Outro estudo concluiu que, para além da quebra de produção de leite, a infeção subclínica manifesta-se negativamente na mortalidade e na fertilidade dos efetivos (Sayers, 2017).

A IBP resulta na relutância dos animais em realizar a cobrição, como resultado das infeções secundárias da mucosa genital (Graham, 2013) e casos de epididimite também estão descritos (Newcomer & Givens, 2016). Na IPV as lesões surgem a nível da mucosa vaginal, com a formação de pústulas, a vulva está edemaciada e a micção é frequente, em que os animais manifestam dor (Fenner *et al.*, 2010a). O corpo lúteo é a principal estrutura ovárica afetada com a infeção do BoHV-1, que se manifesta com alterações do tempo de duração do ciclo éstrico (Chase *et al.*, 2017). A infeção por via venérea, no momento da conceção, pode provocar metrite, endometrite necrosante e o ooforite. Quando ocorre em fases mais avançadas do ciclo éstrico diminui a taxa de conceção (Graham, 2013; Caldow *et al.*, 2018).

3.4.5. Diagnóstico

Em fetos abortados, o diagnóstico pode-se estabelecer pelo isolamento do agente a partir de amostras de fígado ou placenta, por imunohistoquímica, com recurso a anticorpos monoclonais e pela imunofluorescência direta em amostras de rim congeladas (Anderson, 2007). Um meio de diagnóstico mais rápido, com melhor sensibilidade e especificidade é o RT-PCR,

que pode ser realizado a partir das mesmas amostras que os métodos anteriores (Nettleton & Russell, 2017). O RT-PCR consegue detetar pequenas quantidades de vírus pela análise de amostras recolhidas por zaragatoas nasais, oculares, vaginais e prepuciais, amostra de sêmen, lavagens prepuciais, corrimento vaginal e amostra de sangue (Kaur & Chandra, 2016). A sua aplicação está limitada ao custo da técnica, comparativamente aos métodos serológicos, pelo que o seu uso é mais frequente no diagnóstico de infeções agudas (Beer, 2012).

Em bovinos adultos, a realização do teste ELISA (ELISA indireto ou ELISA de bloqueio) para pesquisa de anticorpos é um dos métodos que permite estabelecer o diagnóstico da infeção por BoVH-1 e que é frequentemente utilizado. A deteção de anticorpos é possível a partir do nono dia de infeção e os animais infetados produzem anticorpos durante toda a sua vida (Raaperi *et al.*, 2010). O teste deve ser realizado em amostra emparelhada, com a primeira amostra colhida na fase aguda da doença e repetição entre as duas a quatro semanas seguintes. Em animais vacinados é necessário fazer a prova de bloqueio de modo a identificar a presença de anticorpos para a glicoproteína deletada da vacina, ao passo que nos animais não vacinados a pesquisa de quaisquer anticorpos para BoHV-1 tem valor diagnóstico (Beer, 2012).

Nos animais não vacinados, a seroconversão de negativo para positivo nos testes emparelhados é indicativa de infeção pelo vírus. Um aumento de, pelo menos, quatro vezes o título de anticorpos também é indicativo de infeção/recrudescimento do estado de latência (Nettleton & Russell, 2017). Ainda que a sensibilidade e especificidade dos testes ELISA disponíveis tenha vindo a ser melhorada significativamente (Beer, 2012; Nettleton & Russell, 2017), os resultados obtidos a partir de amostras isoladas têm um valor diagnóstico limitado e apenas permitem conhecer o estatuto sanitário do animal. Um resultado positivo indica se o animal foi infetado, mas não permite estabelecer quaisquer conclusões quanto à etiologia da doença que manifesta (Nettleton, & Russell, 2017).

O ensaio ELISA realizado em amostra de leite é frequentemente utilizado no controlo da infeção ao nível da exploração, pelo que constitui parte das estratégias de monitorização dos planos de controlo e erradicação do BoHV-1 (Raaperi *et al.*, 2014). A sensibilidade e especificidade deste método podem ser melhoradas com o recurso a técnicas de concentração de anticorpos da amostra, ainda que a deteção de anticorpos esteja dependente de um valor de prevalência de infeção próximo dos 10% (Tignon *et al.*, 2017).

O ELISA de bloqueio para pesquisa de anticorpos para a gB tem maior sensibilidade comparativamente com a pesquisa para gE ou o ELISA indireto, em amostras de sangue. Nas amostras de leite, a pesquisa de anticorpos pela técnica ELISA indireto apresenta melhores resultados, pelo que alguns planos de controlo e erradicação da doença recomendam as provas laboratoriais de controlo da infeção consoante as características da vacina aplicada ao efetivo (Bange *et al.*, 2012).

3.4.6. Controlo e erradicação

As estratégias de controlo e erradicação do vírus da IBR assentam nos programas de vacinação e nos programas de abate dos animais infetados. Na Europa, a Finlândia, Noruega, Dinamarca, Suécia, Suíça e Áustria, implementaram a estratégia de identificação dos animais positivos, por serologia, e abate como medida de erradicação do BoHV-1. Ainda que seja a estratégia mais rápida e eficiente na erradicação do vírus, ao nível da exploração, a sua aplicação deve ter em consideração a incidência no efetivo bovino (Raaperi *et al.*, 2014).

A vacinação é a principal estratégia de controlo da doença. Atualmente, estão disponíveis vacinas que permitem a distinção entre animais vacinados e animais infetados. A ausência de uma glicoproteína na vacina permite a pesquisa serológica do vírus pela deteção de anticorpos específicos para essa glicoproteína. No caso do BoHV-1, as vacinas disponíveis apresentam a deleção da gE ou gB e o diagnóstico de animais positivos faz-se pelo método ELISA de bloqueio (Raaperi *et al.*, 2014).

Outra faculdade das vacinas disponíveis para o BoHV-1 é a existência de vacinas mortas e vacinas vivas atenuadas, ambas disponíveis com a deleção da gE. Ainda que o uso de algumas vacinas vivas atenuadas tenha sido associado a aborto em fêmeas gestantes, existem atualmente vacinas seguras para qualquer fase produtiva e reprodutiva dos animais (Chase *et al.*, 2017). Porém, as vacinas vivas atenuadas podem resultar na manifestação de sinais clínicos, visto que há resposta imunitária semelhante à infeção natural. Comparativamente com as vacinas mortas, é esperado que confiram uma maior proteção ao animal vacinado (Caldow *et al.*, 2018).

O maior desafio da vacinação consiste na vacinação de animais sob condições de stress. Os atos médico-veterinários deste género costumam estar associados à realização de outros procedimentos ou à movimentação de animais. Uma vez que o stress é o fator de reativação das infeções latentes, deve-se ter em atenção as condições em que realizam estes procedimentos (Levings & Roth, 2013b).

A monitorização de infeção a partir do método ELISA na amostra de leite de tanque em explorações que realizam protocolo de vacinação com vacinas marcadas tem vindo a ser estudada com o intuito de validar este procedimento como método de controlo da infeção (Muratore *et al.*, 2017). Quando a monitorização consiste na serologia de amostras de sangue, deve-se ter em atenção que o resultado serológico da pesquisa de anticorpos pode dar resultados falsos negativos na medida em que os animais com infeção latente podem ter quantidades de anticorpos em circulação inferiores às quantidades mínimas para deteção no teste (Geraghty *et al.*, 2012).

A nível comunitário, de modo a reduzir a incidência das infeções a partir da inseminação artificial, a diretiva 2003/43/CEE da União Europeia restringe os centros de reprodução à utilização de animais não infetados e não vacinados para o BoHV-1.

3.5. Impacto económico da doença respiratória bovina

As falhas recorrentes do controlo e do tratamento de animais com DRB representam um grande custo para os produtores, que é agravado pela baixa *performance* produtiva dos animais infetados (Williams, 2008).

De forma sucinta, as perdas económicas associadas à DRB podem ser classificadas em:

- a) Custos associados aos tratamentos;
- b) Custos associados à mortalidade e abate precoce;
- c) Custos associados à diminuição da *performance* produtiva.

O ponto a) inclui os serviços médico-veterinários e medicamentos necessários ao tratamento dos animais que manifestam doença clínica. A taxa de mortalidade da DRB pode ser baixa, mas a recorrência dos quadros de pneumonia e recrudescimento de infeções conduzem a quadros de doença respiratória crónica que culminam no abate precoce de bovinos reprodutores e fêmeas de aptidão leiteira, pelo que esses custos estão centrados pelo ponto b). Por último, no ponto c) concentram-se as perdas económicas resultantes da diminuição do ganho de peso, diminuição da fertilidade, aumento da idade ao primeiro parto e diminuição da produção de leite, muitas vezes marcada pela baixa produção na primeira lactação (Van der Fels-Klerx *et al.*, 2001).

Os animais que são enviados para matadouro por resultado de um crescimento lento ou retardado manifestam, na sua maioria, doença respiratória crónica ou histórico de tratamentos repetidos para DRB (Guterbock, 2014). O *feedback* fornecido pelo matadouro é uma ferramenta útil na avaliação da severidade das lesões provocadas pela DRB, bem como na estimativa das perdas associadas ao aproveitamento da carcaça (Williams, 2008). Estudos indicam uma taxa de refugo de 3% do efetivo associada a DRB, em explorações leiteiras dos Estados Unidos da América (Guterbock, 2014).

Outro estudo, conduzido em 2016, indicou que as falhas de transferência de imunidade passiva em bovinos podem representar um custo próximo dos 140€ por animal. Tendo em conta que as manifestações de diarreia neonatal e pneumonia enzoótica dos vitelos estão associadas às falhas de transferência de imunidade passiva, uma boa gestão do colostro é fundamental para reduzir a incidência da DRB e consequentemente os custos associados à sua prevalência e incidência nas explorações leiteiras (Raboisson *et al.*, 2016).

Em bovinos adultos, Fourichon e colegas (2005) determinaram que as perdas associadas à infeção por BVDV compreendem-se entre os 11€ e os 19€ por cada 1000L de leite produzido. As estimativas dos custos por animal, por ano variam entre os 13€ e os 160€, sendo que estão diretamente relacionados com o estatuto da exploração para o agente e da severidade das infeções, associada à estirpe do vírus (Fourichon *et al.*, 2005).

3.6. Estratégias de controlo e monitorização da doença respiratória bovina

Os princípios básicos do controlo das doenças infecciosas assentam na eliminação dos reservatórios e na diminuição da transmissão entre animais portadores e animais suscetíveis (Newcomer *et al.*, 2017). Para que haja controlo da DRB é necessário reduzir a exposição aos agentes patogénicos, estimular a imunidade dos animais da exploração, através da vacinação e administração de colostro de boa qualidade e gerir todos os fatores de risco associados ao ambiente e à transmissão dos agentes, pela aplicação e cumprimento dos planos de biossegurança nas explorações (Edwards, 2010). A execução de planos de controlo e erradicação em alguns países da Europa conseguiu controlar as manifestações clínicas da DRB pelo controlo de um ou mais dos agentes virais envolvidos na etiologia desta síndrome e deste modo reduzir os custos associados à sua incidência (Raaperi *et al.*, 2014).

Estão disponíveis no mercado várias opções vacinais para os agentes da DRB. As vacinas frequentemente utilizadas são polivalentes e conferem proteção para os quatro agentes virais da DRB. Relativamente aos agentes bacterianos, existem também diversas opções de vacinação para os agentes *Pasteurella multocida*, *Mannhaemia haemolytica* e *Histophilus somni* (Edwards, 2010).

A prevenção dos agentes virais permite reduzir a incidência de casos clínicos dos animais infetados, ainda que os agentes permaneçam em circulação pela exploração. Em planos de controlo e erradicação, como no exemplo do BoHV-1, é necessário o uso de vacinas vivas marcadas, de modo a distinguirem-se os animais positivos dos animais vacinados, pelos métodos serológicos (Raaperi *et al.*, 2014).

Em centros de engorda de bovinos é frequente a aplicação de protocolos de metafilaxia. Esta prática baseia-se na administração de antimicrobianos a um grupo de animais, uma única vez, com moléculas com boa distribuição pulmonar e efeito antimicrobiano sobre os agentes bacterianos da DRB. Desta forma, o recurso a antimicrobianos após o transporte ou quando se juntam animais provenientes de locais diferentes permite reduzir a incidência de pneumonia pelos agentes bacterianos, sendo que os macrólidos e cefalosporinas são os grupos de fármacos frequentemente utilizados (Edwards, 2010).

Estudos recentes sugerem a aplicação de estratégias de monitorização da temperatura corporal dos vitelos para deteção precoce de animais com DRB. Os *FeverTags*, dispositivos

auriculares que fornecem leituras da temperatura corporal em intervalos de 15 minutos, foram desenvolvidos nos Estados Unidos da América e emitem um sinal luminoso sempre que a temperatura for igual ou superior a 39,7°C durante um período superior a seis horas. Como a febre surge nas fases iniciais da doença, a sua deteção precoce permite administrar anti-inflamatórios não esteroides e conseqüentemente reduzir o consumo de antimicrobianos no tratamento destas infeções (Mahendran, 2018).

Em 2014, McGuirk e Peek propuseram o *Calf Respiratory Scoring Chart* (tabela de pontuação respiratória de vitelos) de modo a avaliar os sinais clínicos que os vitelos apresentavam. Os parâmetros avaliados são a temperatura retal, tosse, corrimento nasal, ocular e a posição das orelhas. A pontuação para cada variável vai de zero a três e os autores propõem o tratamento a todos os vitelos que reúnam um total de quatro ou mais pontos. Deste modo, a deteção precoce pela aplicação do *Calf Respiratory Scoring Chart* permite detetar a doença respiratória em fases iniciais, instituir tratamentos e reduzir o consumo de antimicrobianos, assim como os quadros crónicos de pneumonia em vitelos (McGuirk & Peek, 2014).

4. Estudo de caso: Caracterização da infecção por BVDV e BoHV-1 em explorações leiteiras da ilha de São Miguel, Açores.

4.1. Introdução

A infecção pelos agentes virais da DRB ocorre em larga escala na ilha de São Miguel, ainda que se desconheçam os valores de incidência e prevalência da infecção por cada um destes vírus.

O governo dos Açores, através do Laboratório Regional de Veterinária, fez um levantamento de dados relativamente aos vírus BoHV-1 e BVDV em que as taxas de positividade aproximavam-se dos 45-50% e 55-60%, respetivamente. A percentagem de animais persistentemente infetados deverá ser inferior a 1% (informação disponível no *site* do governo dos Açores).

Com a realização deste trabalho pretende-se estudar a infecção pelos agentes virais da DRB que têm um impacto negativo na *performance* reprodutiva dos efetivos bovinos, numa conhecida população, sem esquecer que as doenças que se manifestam pelas perturbações a nível da fertilidade são muitas e parte delas circulam nos efetivos leiteiros da ilha de São Miguel, como por exemplo a Neosporose, Clamidiose ou Febre Q.

Como principais objetivos do estudo de caso surgem:

1. Avaliar a prevalência de animais com serologia positiva para Pi-3, BRSV, BVDV e BoHV-1 em 13 explorações leiteiras da ilha de São Miguel;
2. Avaliar a prevalência de animais com serologia positiva para os agentes virais da DRB dentro dos grupos etários;
3. Avaliar o efeito de fatores de manejo na prevalência de serologia positiva para BVDV e BoHV-1;
4. Avaliar o efeito da serologia positiva para BVDV e BoHV-1 na prevalência de infecção respiratória, retenção de membranas fetais, metrite, morte embrionária e vacas *repeat breeders*;

4.2. Material e métodos

4.2.1. Explorações

O presente trabalho foi conduzido em 13 explorações pecuárias da ilha de S. Miguel, com a distribuição geográfica apresentada na tabela 13 e figura 12. Em cada exploração, um lote de vacas em lactação e um lote de novilhas foram selecionados de forma aleatória para recolha de amostra de sangue e envio para serologia.

De forma a serem incluídas neste trabalho, as explorações tinham de cumprir com os seguintes critérios:

1. Ausência de protocolos vacinais implementados para controlo dos agentes etiológicos da DRB;
2. Manifestação clínica de doença respiratória em bovinos adultos ou vitelos;

Tabela 13: Localidades das explorações pecuárias.

Exploração	Local da Exploração
A	Achadinha
B	Gramas
C	São Brás
D	Arrifes
E	Arrifes
F	Arrifes
G	Cabouco
H	Covoada
I	Fajã de Cima
J	Macela
K	Ponta Garça
L	Fenais da Luz
M	Queimadas

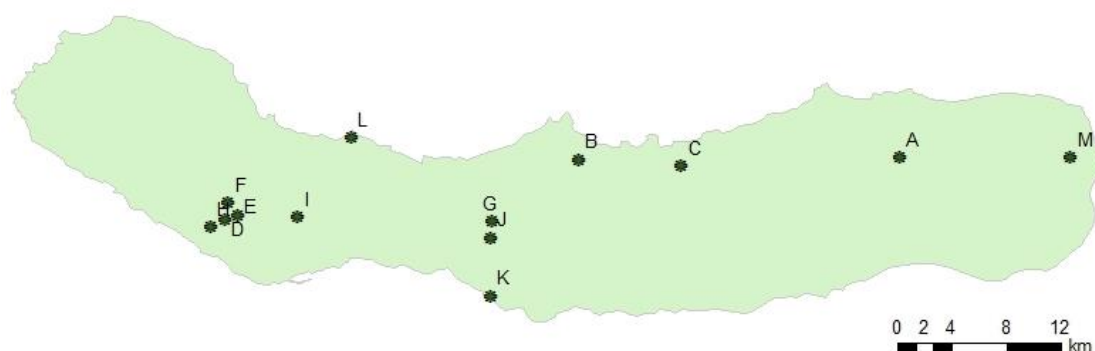


Figura 12: Mapa da ilha de São Miguel e distribuição geográfica das explorações inseridas no trabalho experimental.

4.2.2. Amostragem

Por limitações financeiras foi estipulado que em cada exploração poderiam ser recolhidas 10 amostras de sangue em vacas e 10 amostras de sangue em novilhas. As vacas aleatoriamente selecionadas tinham de ter uma idade superior aos dois anos e as novilhas teriam de ter uma idade superior a 8 meses, de modo a não existir qualquer interferência de anticorpos maternos e sem terem iniciado a primeira lactação.

O número de amostras estipulado por exploração não foi sempre respeitado uma vez que pela disponibilidade dos produtores nem sempre foi possível recolher todas as amostras. Nas explorações **B, C, D, F, H, I e M** foram recolhidas as amostras a todas as novilhas elegíveis pelos critérios estipulados presentes na exploração.

Na tabela 14 estão registados os dados referentes ao número de animais presentes na exploração e o número de animais em lactação, a constituição da amostra e a representatividade da amostra relativamente ao número de vacas em lactação e ao efetivo total. Na tabela 15 regista-se a distribuição da amostra, por exploração. Foram selecionadas 128 vacas e 106 novilhas de forma aleatória, o que constitui um universo de 234 animais avaliados serologicamente para os quatro agentes virais da DRB.

Tabela 14: Dados relativos ao número de animais por exploração, animais em lactação e respetivos números de amostras colhidas e distribuição da amostra, por exploração.

Exploração	Animais		Amostra por exploração		Representatividade		
	Total	Lactação	Vacas	Novilhas	Total	Vacas lactação	Total
A	124	75	10	10	20	13%	16%
B	120	80	10	7	17	13%	14%
C	190	120	9	9	18	8%	9%
D	225	125	10	11	21	8%	9%
E	120	61	10	10	20	16%	17%
F	130	68	10	4	14	15%	11%
G	275	80	10	10	20	13%	14%
H	100	53	12	11	23	23%	23%
I	215	82	10	9	19	12,2%	8,8%
J	120	52	10	10	20	19%	17%
K	150	48	10	10	20	21%	13%
L	200	140	13	0	13	9,3%	6,5%
M	105	54	4	5	9	7,4%	8,6%
Total			128	106	234		

Tabela 15: Distribuição da amostra, por exploração (n=234).

Exploração	Número de amostras	Percentagem	Exploração	Número de amostras	Percentagem
A	20	8,5%	H	23	9,8%
B	17	7,3%	I	19	8,1%
C	18	7,7%	J	20	8,5%
D	21	9,0%	K	20	8,5%
E	20	8,5%	L	13	5,6%
F	14	6,0%	M	9	3,8%
G	20	8,5%	Total	234	100%

4.2.3. Inquérito epidemiológico

Foi realizado um questionário aos produtores, disponível no anexo I, de modo a reunir informação sobre o sistema de produção, aspetos relacionados com o manejo e sobre as afeções mais frequentes na exploração, que constituem as variáveis do estudo, sendo elas:

A. Fatores associados ao manejo das explorações:

1. Aquisição de animais para a exploração;
2. Utilização de cobrição natural;

B. Afeções presentes nas explorações:

1. Infeção respiratória;
2. Retenção de membranas fetais;
3. Metrite;
4. Vacas *repeat breeders*;
5. Morte embrionária e aborto;

O inquérito foi realizado pela mesma pessoa e a informação relativa às afeções reprodutivas foi confirmada com a consulta dos registos dos produtores, onde estes registavam os tratamentos de pneumonia, metrite e retenção de membranas fetais. Foi possível conhecer o número de inseminações artificiais realizadas por animal, pelo registos do serviço de inseminação da AJAM-CJA, pelo que animais com mais de três inseminações consecutivas foram considerados *repeat breeders* e as fêmeas que registavam uma inseminação após um diagnóstico de gestação positivo foram apontadas como mortes embrionárias ou aborto, dados registados pelo médico veterinário responsável pelo acompanhamento reprodutivo da exploração.

Para definir se uma afeção era ou não frequente, foi estipulado que uma prevalência igual ou superior a 5% do efetivo em lactação merece atenção e deve ser apontada como variável positiva para a exploração.

4.2.4. Serologia

Fez-se a recolha da amostra de sangue a partir da veia ou artéria coccígea mediana. A amostra de sangue total foi colocada em tubo seco e enviada para laboratório para serologia pelo método ELISA. Relativamente ao BVDV, fez-se a prova laboratorial ELISA para pesquisa de anticorpos para a proteína P80. A pesquisa de anticorpos totais foi a prova realizada para os vírus BoHV-1 e Pi-3. O método ELISA indireto permitiu a pesquisa de anticorpos específicos para o BRSV.

4.2.5. Análise estatística

O programa *Microsoft Excel*[®] foi utilizado para reunir os dados serológicos, os dados obtidos pelo inquérito epidemiológico e para construir as tabelas e os gráficos apresentados.

Numa segunda parte do trabalho, de modo a testar a independência das variáveis, calcular as prevalências e fazer a análise de variâncias (ANOVA – Analysis of variance) dependentes de um fator, recorreu-se ao programa *IBM SPSS*[®] *Statistics 24*. Os valores foram considerados significativos quando o valor-p foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

4.3. Resultados

Os resultados encontram-se divididos em quatro tópicos:

- Inquérito epidemiológico;
- Prevalências e resultados serológicos;
- Contributo dos fatores de manejo da exploração na prevalência de BVDV e BoHV-1;
- Efeito das prevalências dos vírus BVDV e BoHV-1 na infeção respiratória e afeções reprodutivas presentes na exploração.

4.3.1. Inquérito epidemiológico

Os resultados obtidos pelo inquérito epidemiológico estão descritos nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16: *Explorações em que existe o hábito de adquirir animais para o efetivo e explorações em que há recurso à cobrição natural.*

Exploração	Hábito de adquirir animais	Recurso à cobrição natural
A	X	X
B	X	
C	X	
D		X
E		X
F		X
G		X
H		X
I	X	X
J		X
K	X	
L	X	X
M	X	X

Tabela 17: Afeções consideradas frequentes em cada exploração.

Exploração	Infeção respiratória	Retenção de membranas fetais	Metrite	Vacas repeat breeders	Morte embrionária
A				X	X
B	X		X		
C	X		X		
D				X	X
E	X				
F				X	X
G	X		X	X	X
H	X		X	X	X
I	X	X	X	X	X
J		X	X	X	
K	X			X	
L	X	X	X	X	
M				X	

4.3.2. Estudo de prevalências e resultados serológicos

A tabela 18 reúne os valores de prevalência de animais com resultado serológico positivo no total de animais amostrados nas 13 explorações (n=234). A tabela 19 apresenta os valores de prevalência em função do grupo etário: vacas (n=128) e novilhas (n=106).

Tabela 18: Prevalência de animais seropositivos na amostra (n=234).

Vírus	Prevalência (média ± DP (%))	sig.
PI3	86% ± 0,344	p<0,001
BRSV	67% ± 0,472	p<0,001
BVDV	42% ± 0,495	p<0,001
BoHV-1	39% ± 0,489	p<0,001

Tabela 19: Prevalência de animais seropositivos em função do grupo etário em que se inserem: vacas (n=128) ou novilhas (n=106).

Vírus	Grupo etário	Prevalência (média ± DP (%))	sig.
Pi-3	Vacas	97% ± 0,175	p<0,001
	Novilhas	74% ± 0,443	
BRSV	Vacas	82% ± 0,385	p<0,001
	Novilhas	48% ± 0,502	
BVDV	Vacas	52% ± 0,501	p<0,001
	Novilhas	30% ± 0,461	
BoHV-1	Vacas	68% ± 0,468	p<0,001
	Novilhas	5% ± 0,213	

4.3.2.1. Pi-3

A tabela 20 reúne as prevalências por exploração para o vírus Pi-3, com base na totalidade dos animais serologicamente testados para a respetiva exploração.

Tabela 20: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus Pi-3.

Exploração	Número de amostras	Prevalência (média ± DP (%))
A	20	85% ± 0,366 ^a
B	17	100% ± 0,000 ^a
C	18	72% ± 0,461 ^{a,c}
D	21	100% ± 0,000 ^{a,d}
E	20	95% ± 0,224 ^{a,d}
F	14	64% ± 0,497 ^{a,c,e,f}
G	20	100% ± 0,000 ^{a,d,g}
H	23	61% ± 0,499 ^{b,c,e,f,h}
I	19	100% ± 0,000 ^{a,d,g,i}
J	20	60% ± 0,503 ^{b,c,e,f,h,j}
K	20	100% ± 0,000 ^{a,d,g,i,k}
L	13	92% ± 0,277 ^{a,e,g,i,k}
M	9	100% ± 0,000 ^{a,d,g,i,k}
Total	234	86% ± 0,344

Linhas com diferentes letras diferem entre si ($p < 0,05$)

Nos gráficos 3 e 4 registam-se os resultados serológicos e as respetivas Fr dos lotes de vacas e novilhas, respetivamente, por exploração.

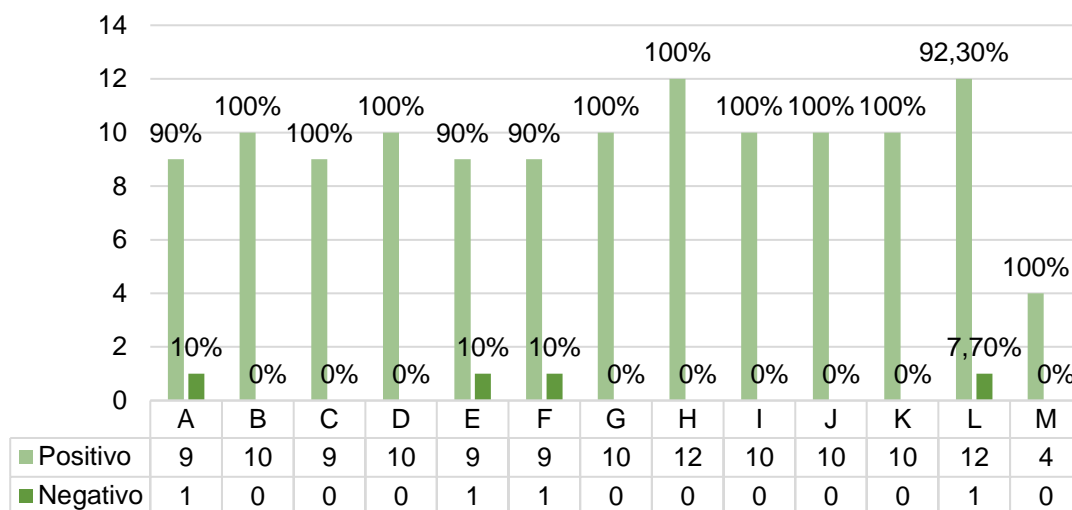


Gráfico 3: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos do vírus Pi-3 em vacas, por exploração (n=128) e respetivos valores de Fr.

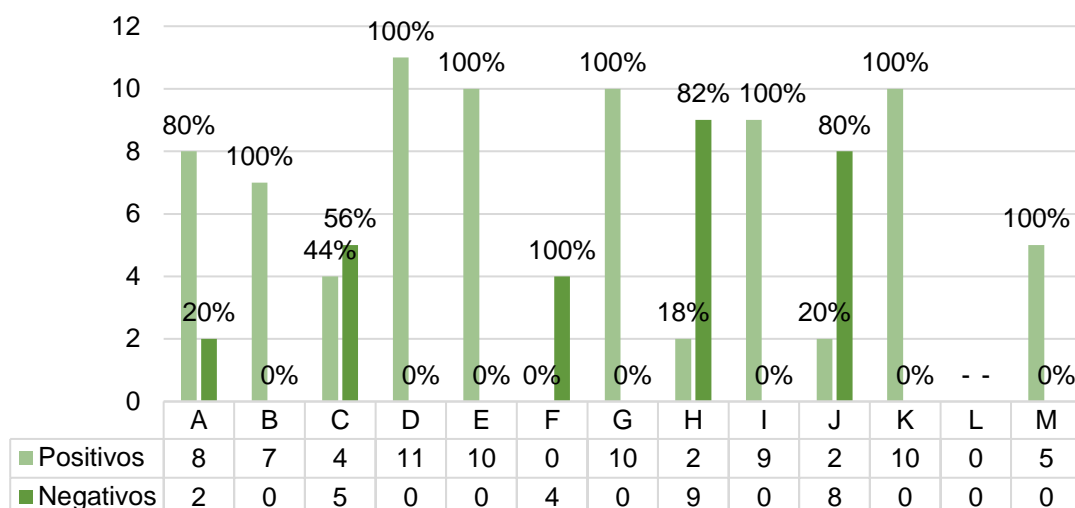


Gráfico 4: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos do vírus Pi-3 em novilhas, por exploração (n=106) e respectivos valores de Fr.

4.3.2.2. BRSV

As prevalências por exploração para o vírus BRSV estão reunidas na tabela 21. Pelos gráficos 5 e 6 pode-se observar os resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos por exploração, em lotes de vacas e novilhas, respectivamente, assim como os valores de Fr obtidos.

Tabela 21: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus BRSV.

Exploração	Número de amostras	Prevalência (média ± DP (%))
A	20	40% ± 0,503 ^a
B	17	94% ± 0,243 ^b
C	18	56% ± 0,511 ^{a,c}
D	21	90% ± 0,301 ^{b,d}
E	20	95% ± 0,224 ^{b,d}
F	14	86% ± 0,363 ^b
G	20	50% ± 0,513 ^{c,e,f,g}
H	23	48% ± 0,511 ^{c,e,f,g}
I	19	79% ± 0,419 ^{b,h,i}
J	20	50% ± 0,513 ^{a,c,e,f,g,j}
K	20	70% ± 0,470 ^b
L	13	69% ± 0,480 ^a
M	9	33% ± 0,500 ^{a,c,e,f,g,j,l}
Total	234	86% ± 0,344

Linhas com diferentes letras diferem entre si (p<0,05)

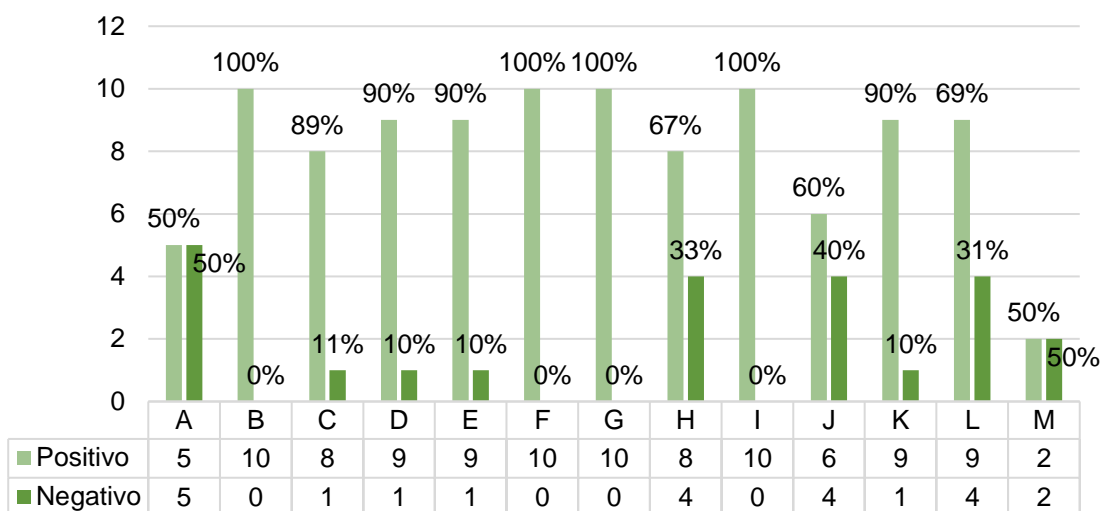


Gráfico 5: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para o BRSV em vacas, por exploração (n=128) e respectivos valores de Fr.

Pelo gráfico 5 observa-se que apenas 23 das 128 vacas incluídas no estudo obtiveram resultados negativos na pesquisa de anticorpos específicos para o agente e todas as explorações têm o agente em circulação. O número de novilhas com serologia negativa é bastante superior.

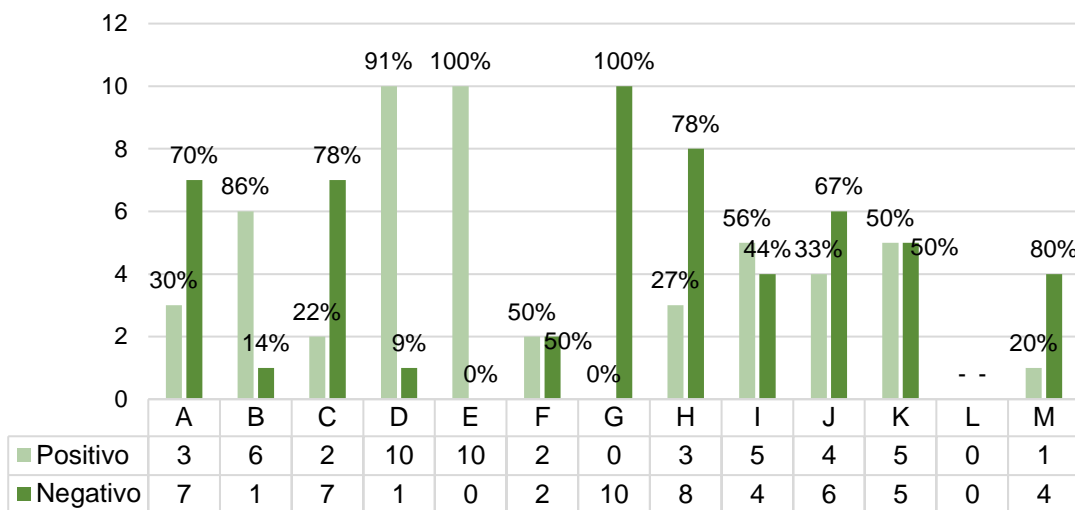


Gráfico 6: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para o BRSV em novilhas, por exploração (n=106).

4.3.2.3. BVDV

A tabela 22, relativa ao BVDV, reúne as prevalências por exploração. Nos gráficos 7 e 8 estão registados os resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para a proteína p80 do BVDV em vacas e novilhas, respetivamente.

Tabela 22: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus BVDV.

Exploração	Número de amostras	Prevalência (média ± DP (%))
A	20	15% ± 0,366 ^a
B	17	24% ± 0,437 ^a
C	18	17% ± 0,383 ^a
D	21	43% ± 0,507 ^{b,d}
E	20	30% ± 0,470 ^a
F	14	64% ± 0,497 ^{b,c,d,f}
G	20	10% ± 0,308 ^{a,e,g}
H	23	43% ± 0,507 ^{b,h}
I	19	84% ± 0,375 ^{b,c,d,e,f,h,i}
J	20	85% ± 0,366 ^{b,c,d,e,f,h,i}
K	20	25% ± 0,444 ^{a,g,j,k}
L	13	100% ± 0,000 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,l}
M	9	22% ± 0,441 ^{a,g,j,m}
Total	234	42% ± 0,495

Linhas com diferentes letras diferem entre si (p<0,05)

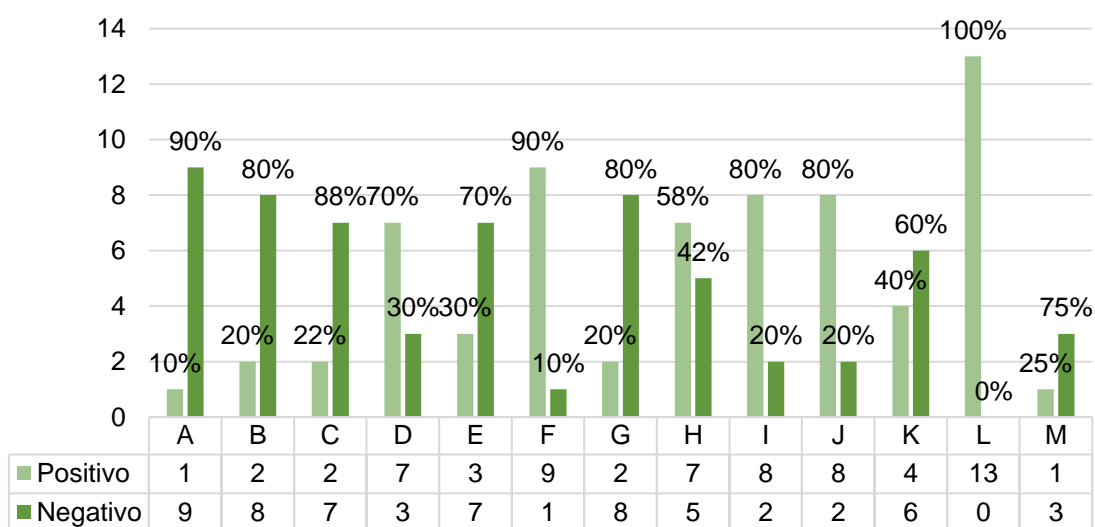


Gráfico 7: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para a proteína p80 do BVDV em vacas, por exploração (n=128) e respetivos valores de Fr.

Ainda que o agente circule em todas as explorações, os lotes de novilhas das explorações F e G apresentam resultados exclusivamente negativos para a deteção de anticorpos para a proteína p80, como se pode observar no gráfico 8.

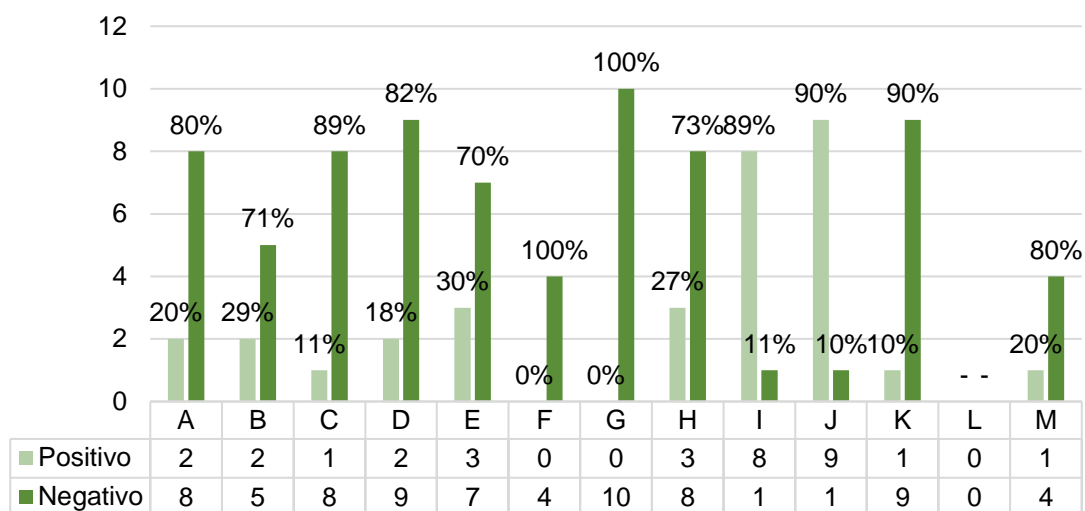


Gráfico 8: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos para a proteína p80 do BVDV em novilhas, por exploração (n=106) e respectivos valores de Fr.

4.3.2.4. BoHV-1

As prevalências por exploração para o agente da IBR estão presentes na tabela 23.

Tabela 23: Prevalências de animais seropositivos por exploração para o vírus BoHV-1.

Exploração	Número de amostras	Prevalência (Média ± DP (%))
A	20	0% ± 0,000 ^a
B	17	65% ± 0,493 ^b
C	18	50% ± 0,514 ^b
D	21	29% ± 0,463 ^{b,c}
E	20	15% ± 0,366 ^{a,c,d}
F	14	29% ± 0,469 ^{a,c}
G	20	50% ± 0,513 ^{b,f}
H	23	35% ± 0,487 ^{b,c}
I	19	37% ± 0,496 ^b
J	20	40% ± 0,503 ^b
K	20	50% ± 0,513 ^{b,f}
L	13	92% ± 0,277 ^{b,d,e,f,g,h,i,j,k,l}
M	9	44% ± 0,527 ^{b,m}
Total	234	39% ± 0,489

Linhas com diferentes letras diferem entre si (p<0,05).

Os resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos totais para BoHV-1 estão representados nos gráficos 9 e 10.

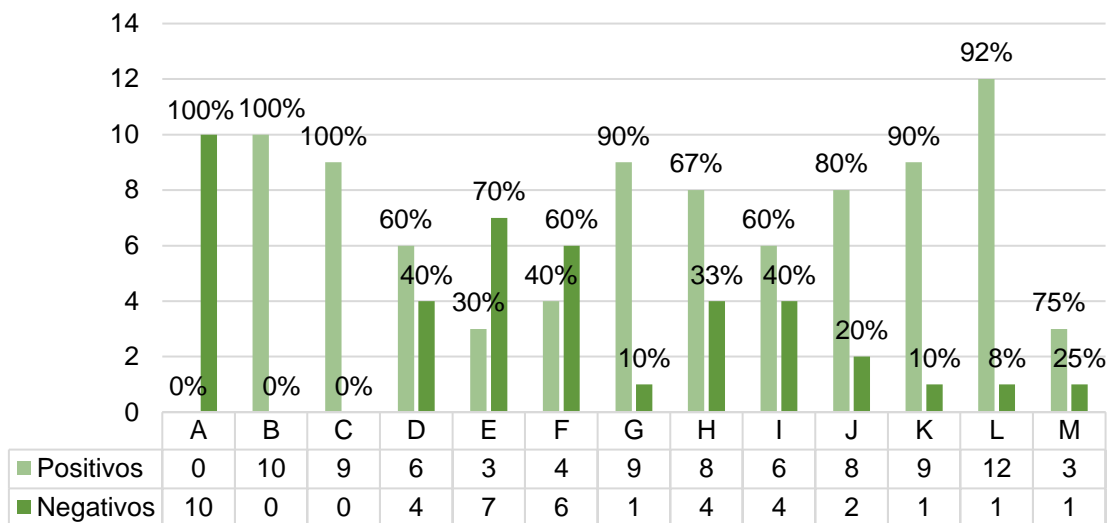


Gráfico 9: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos totais para BoHV-1 em vacas, por exploração (n=128) e respectivos valores de Fr.

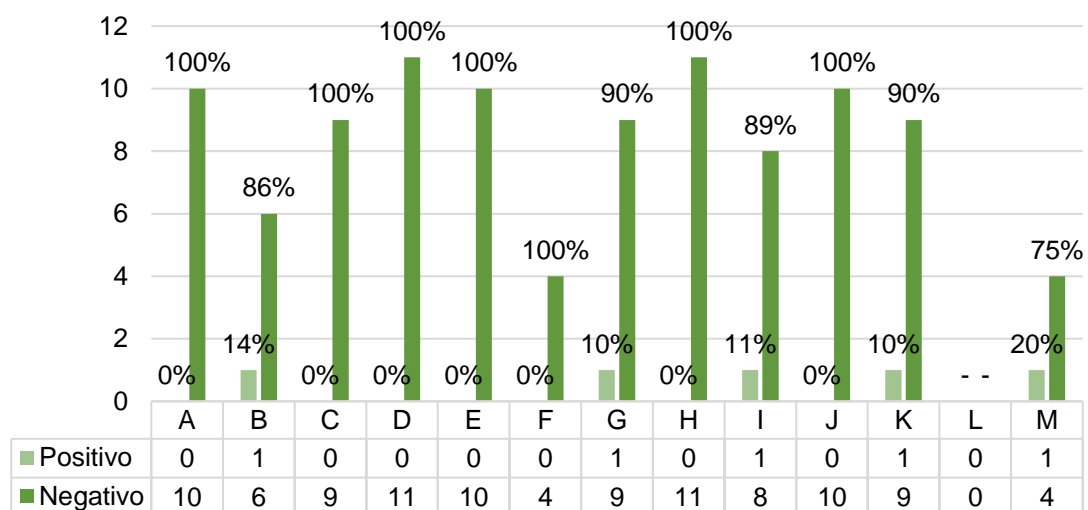


Gráfico 10: Resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos totais para BoHV-1 em novilhas, por exploração (n=106) e respectivos valores de Fr.

Por último, os gráficos 11 e 12 reúnem os dados referentes às frequências relativas dos resultados serológicos positivos para os quatro vírus, com base nos grupos etários, respetivamente.

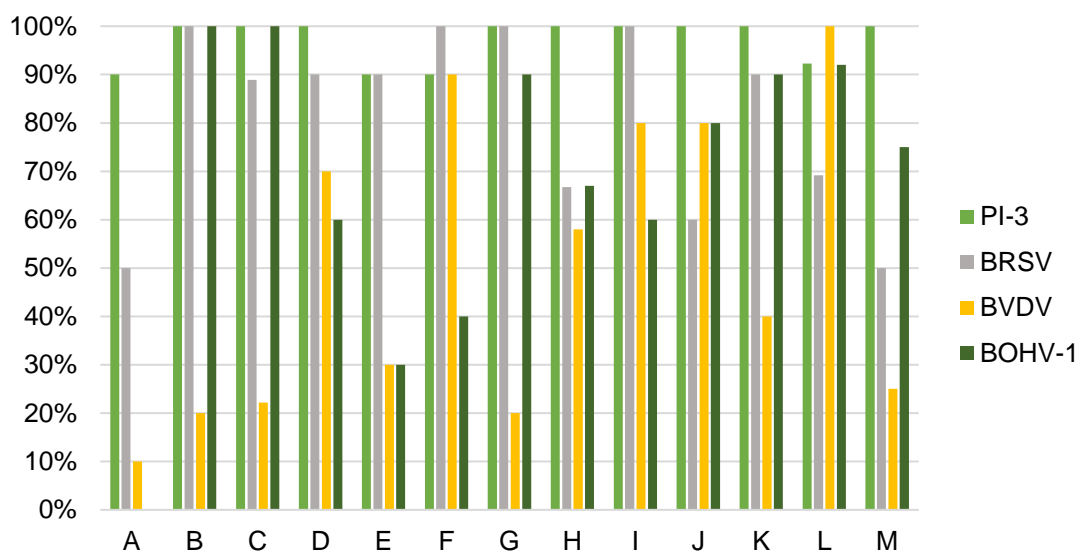


Gráfico 11: Frequências relativas dos resultados serológicos positivos dos lotes de vacas para todos os vírus, de cada exploração.

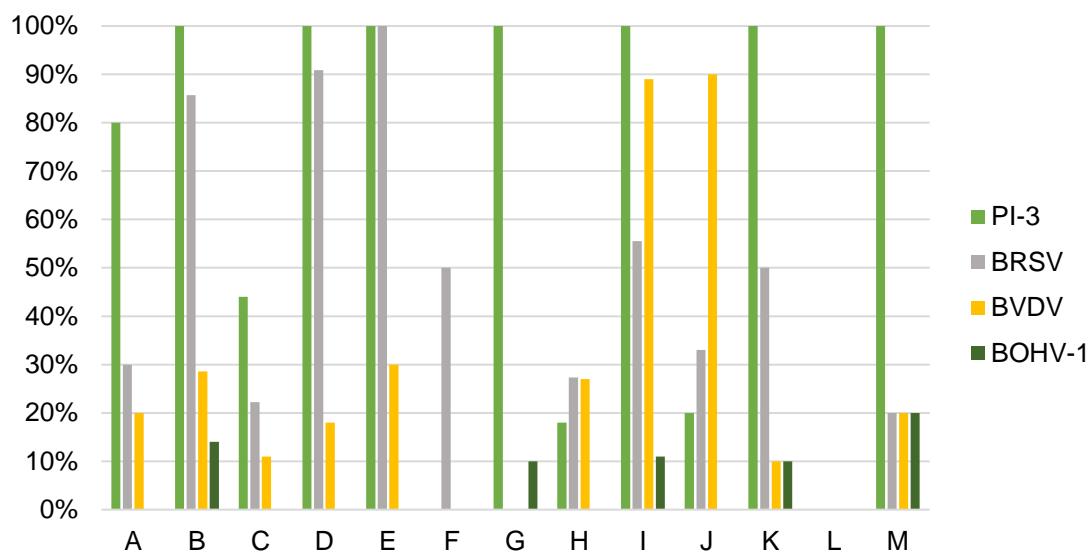


Gráfico 12: Frequências relativas dos resultados serológicos positivos dos lotes de novilhas para todos os vírus, de cada exploração.

4.3.3. Contributo dos fatores de manejo da exploração na prevalência dos agentes virais BVDV e BoHV-1

A tabela 24 apresenta os valores obtidos pela ANOVA dependente do fator *aquisição de animais*, para os vírus BVDV e BoHV-1. O mesmo teste estatístico foi executado com a dependência do fator *cobrição natural*, pelo que se apresentam os resultados na tabela 25.

Quanto aos resultados observados pela análise estatística com recurso à ferramenta informática *IBM SPSS® Statistics 24*, consoante as variáveis a testar, foram utilizados os resultados serológicos dos lotes de vacas ou da totalidade dos animais da exploração, uma vez que não se justifica a utilização dos dados referentes às novilhas para avaliação das variáveis associadas às afeções reprodutivas. Os resultados serológicos da totalidade dos animais foram cruzados com as variáveis *aquisição de animais para a exploração, utilização de cobrição natural e infeção respiratória*.

Tabela 24: Efeito da aquisição de animais na prevalência de animais com serologia positiva para BVDV e BoHV-1 (n=234).

Vírus	Aquisição de animais	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Sim	118	45% ± 0,500	0,418
	Não	116	40% ± 0,491	
BoHV-1	Sim	118	46% ± 0,500	0,048
	Não	116	33% ± 0,472	

Valores $p < 0,05$ representam diferenças significativas entre os grupos

Tabela 25: Efeito da cobrição natural na prevalência de animais com serologia positiva para BVDV e BoHV-1 (n=234).

Vírus	Cobrição natural	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Faz	55	49% ± 0,501	0,000
	Não faz	179	22% ± 0,417	
BoHV-1	Faz	55	35% ± 0,477	0,008
	Não faz	179	55% ± 0,503	

Valores $p < 0,05$ representam diferenças significativas entre os grupos

4.3.4. Efeito da seroprevalência dos vírus BVDV e BoHV-1 na infeção respiratória e afeções reprodutivas presentes nas explorações

A tabela 26 apresenta os valores obtidos pela ANOVA a um fator, sendo a infeção respiratória o fator de dependência, para os resultados serológicos de BVDV e BoHV-1.

Tabela 26: Efeito da seropositividade para BVDV e BoHV-1 na frequência de infeção respiratória (n=234).

Vírus	Infeção respiratória	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Frequente	84	48% ± 0,502	0,220
	Não frequente	150	39% ± 0,490	
BoHV-1	Frequente	84	47% ± 0,501	0,002
	Não frequente	150	26% ± 0,442	

Valores $p < 0,05$ representam diferenças significativas entre os grupos

Os restantes testes ANOVA realizados, com os fatores referentes às afeções reprodutivas, foram realizados apenas com os resultados serológicos do grupo etário das vacas (n=128). Deste modo, as tabelas 27, 28, 29 e 30 reúnem os resultados obtidos para o fator *retenção de membranas fetais*, *metrite*, *vacas repeat breeders* e *morte embrionária e aborto*, respetivamente.

Tabela 27: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de retenção de membranas fetais (n=128).

Vírus	Retenção de membranas fetais	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Alta	33	88% ± 0,331	0,000
	Baixa	95	40% ± 0,492	
	Total	128	52% ± 0,501	
BoHV-1	Alta	33	79% ± 0,415	0,124
	Baixa	95	64% ± 0,482	
	Total	128	68% ± 0,468	

Valores p<0,05 representam diferenças significativas entre os grupos

Tabela 28: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de metrite das explorações (n=128).

Vírus	Metrite	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Alta	74	57% ± 0,499	0,245
	Baixa	54	46% ± 0,503	
	Total	128	52% ± 0,501	
BoHV-1	Alta	74	84% ± 0,371	0,000
	Baixa	54	46% ± 0,503	
	Total	128	68% ± 0,468	

Valores p<0,05 representam diferenças significativas entre os grupos

Tabela 29: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de animais repeat breeders das explorações (n=128).

Vírus	Vacas repeat breeders	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Alta	99	61% ± 0,491	0,000
	Baixa	29	24% ± 0,435	
	Total	128	52% ± 0,501	
BoHV-1	Alta	99	66% ± 0,477	0,304
	Baixa	29	76% ± 0,435	
	Total	128	68% ± 0,468	

Valores p<0,05 representam diferenças significativas entre os grupos

Tabela 30: Efeito da presença de animais seropositivos para BVDV e BoHV-1 nas taxas de morte embrionária e aborto das explorações (n=128).

Vírus	Morte embrionária e aborto	n	Média ± DP (%)	Valor de p
BVDV	Alta	52	63% ± 0,486	0,037
	Baixa	76	45% ± 0,501	
	Total	128	52% ± 0,501	
BoHV-1	Alta	52	63% ± 0,486	0,370
	Baixa	76	71% ± 0,457	
	Total	128	68% ± 0,468	

Valores p<0,05 representam diferenças significativas entre os grupos

4.4. Discussão

Ao considerar a casuística registada durante o estágio, a frequência absoluta observada de casos de pneumonia em animais adultos e jovens foi de 166 casos clínicos, que correspondem a 25,5% do total de casos clínicos registados. Supõe-se que estes valores estejam intimamente ligados à circulação dos agentes virais da DRB nas explorações, pelo que se realça o interesse e a pertinência do tema do estudo de caso realizado.

É de notar que a transmissão dos agentes virais ocorre por contacto direto, aerossóis e em alguns casos por fomites, uma vez que alguns vírus resistem no meio ambiente por períodos consideráveis. As pastagens dos Açores são frequentemente delimitadas por muros baixos, vegetação ou por fio eletrificado, pelo que o contacto entre animais de explorações diferentes e a transmissão de agentes infecciosos por vetores biológicos deverão ser um fator de risco a considerar nas explorações que apresentam explorações contíguas.

O número de amostras recolhidas não foi o mesmo em todas as explorações, sendo que o objetivo seria a recolha de amostras a pelo menos 10% do número de animais em lactação e do número total de animais da exploração. A representatividade calculada é próxima de 10% na maioria das explorações, sendo que quanto maior o número da amostra, maior a representatividade do efetivo. As explorações **C**, **D**, **L** e **M** apresentam valores inferiores a 10% na representatividade das vacas em lactação e no total de animais, assim como a exploração **I**.

Não é possível estabelecer a relação direta entre o resultado serológico de um animal e a afeção que é apontada como frequente para a exploração, ou seja, não é possível afirmar, com base nos dados recolhidos, que os animais que manifestam as afeções dentro da exploração são os mesmos animais que foram selecionados de forma aleatória para pesquisa serológica de anticorpos para os agentes virais. Porém, pela análise das variância foi possível compreender se existe uma relação significativa entre as taxas de positividade para os agentes e as taxas de manifestação clínica de infeção respiratória e as afeções reprodutivas consideradas.

Foi possível quantificar, ainda que de forma relativa, a frequência das afeções apontadas pelos produtores e reduzir o erro na avaliação subjetiva de cada inquirido. Parte das explorações incluídas no estudo fazem recurso à cobertura natural para as novilhas ficarem gestantes. A aquisição de animais para as explorações é uma porta de entrada de agentes externos às explorações.

Os resultados serológicos para o BVDV, BoHV-1 e BRSV são apresentados em títulos de anticorpos detetados pelos métodos laboratoriais. Estes títulos foram convertidos em duas categorias – positivo ou negativo, de modo a permitir o tratamento estatístico e definir o resultado serológico como variável de estudo. Títulos de anticorpos iguais ou superiores a 50 para o BVDV, iguais ou superiores a 10 para o BoHV-1 e títulos superiores a 15 para o BVDV foram considerados como resultados positivos. Para o agente Pi-3, os resultados são apresentados como positivo ou negativo, pelo que não foi necessária qualquer conversão.

A pesquisa de anticorpos em animais não vacinados permite aferir se os animais contactaram ou não com o agente, pelo que é um indicador de circulação dos vírus dentro de um efetivo. Importa referir que um resultado positivo na pesquisa de anticorpos para qualquer um dos quatro agentes em animais não vacinados indica o contacto do animal com os vírus, sendo que este resultado não pode ser considerado diagnóstico de doença, uma vez que carece da prova emparelhada. Deste modo, é possível aferir se existiu contacto com o agente, independentemente da existência de uma infeção no momento da colheita da amostra.

Das explorações selecionadas, importa referir que a exploração **A**, **F** e **G** têm resultados serológicos positivos para a pesquisa de anticorpos para *Neospora*, agente de aborto em bovinos e a exploração **G** tem serologia positiva para pesquisa de anticorpos para *Coxiella burnetii*, agente da Febre Q.

A distribuição da amostra em 10 explorações foi bastante uniforme, em que a percentagem de amostras situa-se entre os 7,3% e os 9,8%. As explorações **F**, **L** e **M** apresentam um valor mais baixo, sendo que a última apenas representa 3,8% do total das amostras.

A prevalência de animais positivos para cada vírus na amostra é de 86% para o Pi-3, 67% para o BRSV, 42% para o BVDV e 39% para o BoHV-1. Estes valores correspondem aos valores esperados, ainda que a prevalência para os dois últimos agentes esteja abaixo dos valores sugeridos pelo Governo dos Açores (informação disponível no *site* do Governo dos Açores). Deve-se ter em conta que o tamanho da amostra, 234 animais, e o número de explorações presentes no estudo, são insuficientes para representar a população de bovinos da ilha de São Miguel.

As prevalências entre grupos etários apresentam diferenças significativas ($p < 0,001$) para os quatro vírus. Em todos os casos, a prevalência de animais positivos em vacas foi superior à prevalência em novilhas. Para o vírus Pi-3 temos 97% de prevalência em vacas e 74% em

novilhas, valores considerados elevados. O BRSV mostrou uma prevalência de 82% e 48% em vacas e novilhas, respectivamente e o BVDV 52% e 30%. A maior diferença de prevalências entre grupos etários foi registada pelo vírus da IBR, com 68% de prevalência em vacas e apenas 5% em novilhas.

Pela interpretação dos resultados serológicos, os vírus BRSV e Pi-3 reúnem o maior número de resultados positivos. Todas as explorações têm resultados positivos para a pesquisa de anticorpos para o Pi-3, sendo que as prevalências foram iguais ou superiores a 90% no grupo das vacas e de pelo menos 44% nos lotes de novilhas. As explorações **B**, **D** e **M** reúnem exclusivamente resultados positivos. Relativamente ao BRSV, as prevalências no lote de vacas variam entre os 50% e os 100%, sendo que quatro explorações registam a totalidade de vacas positivas. Por sua vez, nos lotes de novilhas conclui-se que existe uma grande variedade de prevalência entre as explorações, uma vez que os valores variam entre os 0% (exploração **G**) e os 100% (exploração **E**).

No total, 32 dos 234 animais apresentaram resultado serológico negativo para Pi-3 e 78 animais resultado negativo para a pesquisa de anticorpos para BRSV, o que constitui 13,7% e 33,3% dos animais observados, concluindo-se que os vírus estão amplamente distribuídos nas explorações testadas. Uma vez que a sua manifestação é maioritariamente subclínica (Neill *et al.*, 2015), surgem associados à DRB. O BRSV é considerado um agente endêmico, o que dificulta o estudo de prevalências do agente e a sua manifestação é maioritariamente subclínica (Luzzago *et al.*, 2010).

Relativamente ao BVDV, todas as explorações apresentam resultados serológicos negativos. Nos lotes de vacas, sete explorações assumem uma prevalência inferior a 50% e cinco explorações uma prevalência superior a 70%, sendo que a exploração **L** assume uma prevalência de 100%. Quanto aos lotes de novilhas, temos nas explorações **F** e **G** prevalências de 0% e 10 explorações com prevalências inferiores a 30%.

A exploração **A** não apresenta qualquer serologia positiva para a pesquisa de anticorpos totais para BoHV-1, pelo que a prevalência da exploração para este vírus é nula. Os resultados das restantes explorações são bastante interessantes na medida em que nos lotes vacas temos prevalências superiores a 30%, sendo que em 10 explorações este valor é igual ou superior a 60%. Por sua vez, nos lotes de novilhas, apenas cinco explorações assumem prevalências diferentes de 0%, ainda que estas se concentrem entre os 10% e os 20%, resultado da presença de um animal com serologia positiva em cada uma das explorações **B**, **G**, **I**, **K** e **M**.

Estes resultados sugerem que a infeção das novilhas pode estar associada a dois momentos: no início da vida do animal, em que há a formação de lotes de novilhas de substituição, quer seja na pastagem quer seja por estabulação ou posteriormente, quando entram no grupo de animais em lactação. O contacto com animais mais velhos da exploração

constitui um fator de risco de infeção, assim como o maior número de animais permite uma maior circulação dos agentes infecciosos.

Os animais mais velhos da exploração constituem o principal reservatório de agentes virais e a capacidade destes agentes criarem infeções latentes ou infeções subclínicas garante a sua permanência no efetivo sem que ocorram manifestações clínicas exuberantes, pelo que é frequente a manifestação clínica nos animais mais jovens, quando ocorre o primeiro contacto entre o agente e o hospedeiro (Hilton, 2014; Nettleton & Russell, 2017), ainda que a fase de infeção do sistema de produção (Graham, 2013).

Na totalidade das explorações observadas, os animais estão divididos em grupos consoante a sua idade ou fase produtiva: vitelos, novilhas de substituição, vacas em lactação e vacas em período seco. As características das explorações obrigam a que exista uma separação geográfica entre os diferentes grupos, na maioria das vezes. Associar estes aspetos ao facto de os vitelos serem separados das suas progenitoras logo após o parto, o contacto com animais infetados por estes agentes torna-se limitado, pelo que os resultados serológicos corroboram esta ideia. Os produtores podem constituir um vetor de transmissão dos agentes entre os diferentes grupos de animais, uma vez que na rotina de trabalho circulam pelos diferentes grupos e contactam diretamente com os animais.

Relativamente à comparação das prevalências entre as explorações, é de notar que existem muitas explorações com diferenças significativas para todos os vírus. As tabelas 20, 21, 22 e 23 reúnem a informação relativa a cada vírus, para cada exploração. Pode-se observar as diferenças de seroprevalência bem como as diferenças significativas entre as 13 explorações consideradas. Ainda que se considerem os agentes virais em estudo endémicos da ilha de São Miguel, esta informação está de acordo com o esperado uma vez que os sistemas de produção, os sistemas de manejo e muitos outros aspetos ligados à transmissão dos agentes virais constituem fatores de risco para a infeção.

Pelo gráfico 11 conclui-se que quatro explorações (**D, H, I e L**) reúnem prevalências superiores a 50% para todos os vírus, nos lotes de vacas. O gráfico permite observar também que a exploração **A** apresenta prevalências inferiores a 10% para o BVDV e para o BoHV-1, pelo que se destaca das restantes explorações. Pela análise dos dados das restantes explorações, a dispersão dos resultados permite constatar que cada agente circula de forma independente nas explorações, uma vez que as prevalências são bastante díspares entre explorações e dentro de cada exploração. Conclui-se também que o Pi-3, BRSV, BVDV e BoHV-1 são agentes endémicos das explorações leiteiras da ilha de São Miguel e, tal como esperado, as prevalências para o Pi-3 e BRSV são superiores às dos agentes BVDV e BoHV-1 em quase todas as explorações.

Importa referir que os sistemas de produção animal não são sistemas isolados e os mecanismos com que as doenças se manifestam resultam de um conjunto de fatores ambientais,

do hospedeiro e dos agentes patogénicos (Fulton, 2009; Murray *et al.*, 2017). Deve-se considerar que a totalidade destes fatores, que influenciam a manifestação clínica das doenças ou a epidemiologia e biologia dos agentes virais, não foram possíveis de eliminar ou contabilizar como variáveis do estudo.

No estudo do contributo dos fatores associados ao manejo das explorações sobre as prevalências de animais seropositivos para os vírus BVDV e BoHV-1 existem diferenças claras nas taxas de positividade do BVDV para o fator aquisição de animais 45% para 40%, ainda que esta variação não seja significativa. Uma vez que as explorações infetadas com BVDV podem necessitar de uma maior aquisição de animais de substituição, pelo impacto negativo que o vírus tem sobre a fertilidade e *performance* reprodutiva, o contributo para a infeção e manutenção dentro da exploração pode ser interpretado tanto como causa ou consequência das práticas de entrada de animais de substituição (Gates *et al.*, 2014). Os resultados obtidos podem estar associados ao tamanho da amostra ou ao facto de explorações endémicas não sofrerem com a entrada e saída de animais, visto que o agente circula no efetivo independentemente do contributo deste fator de risco.

Por sua vez, o BoHV-1 apresenta uma variação significativa de 46% para 33% ($p < 0,05$). Isto indica que explorações onde há taxas de positividade altas para o vírus a aquisição de animais para a exploração é uma prática frequente. O contacto com animais de outras explorações é considerado um fator de risco para a transmissão de agentes patogénicos, sendo que a aquisição de animais para a exploração deve respeitar as normas de biossegurança da exploração e não constituir um contributo para a transmissão de BoHV-1 nos efetivos (Nettleton & Russell, 2017).

Nas explorações inquiridas, a cobrição natural é frequentemente utilizada no manejo reprodutivo das novilhas e vacas com uma baixa taxa de conceção. Os machos contactam com um grande número de fêmeas da exploração e são frequentemente animais mais velhos que as novilhas. Outro aspeto relacionado com os machos reprodutores é a possibilidade de serem animais adquiridos para a exploração, que podem provir de explorações infetadas com os vírus e constituírem uma porta de entrada para os agentes na exploração de destino, tal como referido por Graham (2013).

Na cobrição natural, ambos os vírus apresentam resultados significativos, sendo que o BVDV apresenta uma diferença de 49% para 22% ($p < 0,001$) sendo claro o efeito que a cobrição natural tem na transmissão do vírus. Ainda que a principal forma de transmissão do agente seja o contacto direto, a transmissão por via venérea também está descrita (Niskanen & Lindberg, 2004). Outro aspeto é o facto de os machos reprodutores contactarem com todas as fêmeas da exploração, independentemente do grupo etário a que pertencem.

Os valores obtidos para o BoHV-1 são controversos e não estão de acordo com o que seria esperado. Para além de serem valores significativos, têm-se 35% para 55%, o que indica que as prevalências de animais com serologia positiva para este agente são superiores em explorações que não recorrem à cobertura natural como estratégia reprodutiva para os seus efetivos bovinos. Uma maior dimensão da amostra poderá fornecer resultados diferentes dos obtidos, uma vez que a transmissão por via venérea é outro aspeto pertinente no estudo da epidemiologia deste vírus dentro da exploração, que justifica a importância de avaliar serologicamente os machos reprodutores (Levings & Roth, 2013^a; Chase *et al.*, 2017).

No estudo do efeito das seroprevalências para os vírus BVDV e BoHV-1 sobre a infeção respiratória foram utilizados os resultados serológicos de ambos os grupos etários. O BVDV provoca a imunossupressão quando estabelece infeção (Mosier, 2015) ao passo que o BoHV-1 manifesta-se ao nível do trato respiratório superior, quer ocorra ou não envolvimento bacteriano secundário (Jones, 2016).

As diferenças não foram significativas para o BVDV ainda que os resultados sejam de 48% para 39%. As taxas de positividade para o vírus são superiores nas explorações em que há maiores taxas de infeção respiratória. Uma vez mais, é de notar que o tamanho da amostra e a dispersão dos resultados constituem um fator preponderante do resultado dos testes estatísticos. Por outro lado, sabe-se que o BVDV não está descrito como agente de pneumonia em bovinos, mas sim como agente viral envolvido na etiologia da DRB, pelo sinergismo que ocorre com os restantes agentes virais e bacterianos (Bolin & Grooms, 2004) sendo a sua relação com a pneumonia em bovinos avaliada de forma indireta. Ainda que se conheçam os agentes virais e bacterianos envolvidos na DRB, a identificação dos agentes em animais com sinais clínicos de doença respiratória não permite estabelecer com certeza o contributo de cada um para o quadro clínico observado, por se tratar dos efeitos sinérgicos da presença dos diferentes agentes e dos mecanismos de simbiose estabelecidos entre os mesmos (Taylor *et al.*, 2010).

Relativamente ao BoHV-1, as taxas de positividade para o vírus são igualmente superiores em explorações em que há taxas elevadas de infeção respiratória, 47% para 26% ($p < 0,05$). Sabe-se que a infeção pelo agente da IBR manifesta-se maioritariamente pelos quadros de pneumonia, secundária ao desenvolvimento das bactérias comensais ao trato respiratório dos bovinos (Muylkens *et al.*, 2007) ainda que possam existir explorações endémicas em que as manifestações são quase nulas (Pritchard *et al.*, 2003). Deste modo, em bovinos adultos, a infeção pelo vírus da IBR está diretamente relacionada com a DRB (Jones & Chowdhury, 2010).

Quanto ao estudo do efeito da seroprevalência para os vírus sobre as taxas de afeções reprodutivas foram apenas utilizados os resultados serológicos das vacas ($n=128$). Na retenção de membranas fetais apenas se obteve um valor significativo para o BVDV ($p < 0,001$) mas ambos os vírus provaram que as taxas de positividade são superiores em explorações onde as taxas de

retenção de membranas fetais são superiores. São 88% para 40% no BVDV e 79% para 64% na análise do BoHV-1.

Para a metrite, o BoHV-1 apresenta taxas de positividade para o vírus em explorações com altas taxas de metrite são de 84% para 46% em explorações com baixas taxas de metrite ($p < 0,001$). Deste modo, pode-se assumir que existe uma relação entre a seroprevalência para o vírus e a afeção reprodutiva em questão. Esta afeção está diretamente relacionada com a infertilidade observada em efetivos bovinos infetados pelo agente (Graham, 2013) devido ao tropismo do vírus para as células do endométrio (Sheldon *et al.*, 2008).

Ainda que os resultados com o BVDV não sejam significativos, as taxas de positividade são superiores quando há taxas de metrite elevadas (57% para 46%). A metrite e endometrite estão descritas nas infeções por BVDV quando ocorre a morte embrionária, uma vez que a infeção uterina conduz à infeção do embrião (Newcomer & Givens, 2016).

A presença de animais *repeat breeders* em explorações de bovinos leiteiros constitui um obstáculo à eficiência reprodutiva e conseqüentemente à eficiência produtiva dos efetivos. O contributo da seropositividade para os agentes BVDV e BoHV-1 apresenta resultados bastante díspares. Em primeiro lugar, a análise de variância com os dados serológicos do BVDV assumiu valores significativos ($p < 0,001$), contrariamente ao que ocorreu na análise dos resultados do BoHV-1. As taxas de positividade para o primeiro vírus foram consideravelmente discrepantes, pelo que obteve 61% para 29%, ou seja, as taxas de animais seropositivos para BVDV duplicam de explorações em que as taxas de vacas *repeat breeders* passam de baixas para elevadas. A infeção por BVDV está associada a infertilidade e distúrbios reprodutivos (Caldow, 2009; Grooms *et al.*, 2009) o que contribui para o aparecimento de animais considerados *repeat breeders*, conseqüência das taxas de conceção diminuídas (Lanyon *et al.*, 2014).

Para o BoHV-1, as taxas obtidas foram de 66% para 76%. Ainda que a diferença entre elas não seja considerável, estes valores sugerem que existe maior seropositividade para o vírus em explorações em que as vacas *repeat breeders* surgem com menor frequência. Porém, em ambas as taxas apresentadas os valores são bastante elevados, pelo que uma maior amostra seria necessária de forma a avaliar com clareza o efeito dos animais seropositivos para o vírus na presença de animais com esta afeção nas explorações.

Por último, o efeito da seropositividade sobre as taxas de morte embrionária e o aborto também apresenta resultados em certa medida controversos. O BVDV assumiu uma taxa de 63% para 45% ($p < 0,05$), sendo que ambos os valores podem ser considerados elevados para a afeção em questão. O BVDV provoca a morte embrionária e o aborto durante toda a gestação, ainda que seja mais frequente quando a infeção ocorre até aos quinto mês de gestação (Caldow, 2009).

Na análise dos valores obtidos para o vírus da IBR seria expetável que existisse uma vincada relação, uma vez que as infeções de animais seronegativos no início da gestação provocam a morte embrionária e afetam a fertilidade (Chase *et al.*, 2017). Porém, os valores obtidos foram de 63% para 71%, pelo que se deve ter em conta que ambas as taxas são elevadas e que a diferença entre elas é de apenas 8%. É importante considerar que as manifestações reprodutivas estão intimamente ligadas com o serotipo do vírus (Nettleton & Russell, 2017; Sayers, 2017) que neste caso é desconhecido.

Por outro lado, por se tratar de um agente endémico com ampla distribuição entre as diferentes explorações e dentro de cada exploração, seria interessante estudar o número de fêmeas seronegativas no momento de cobrição ou inseminação artificial para compreender a dinâmica do vírus e o papel da infeção nas perdas embrionárias e infertilidade. Conhecer os subtipos presentes na ilha e as respetivas prevalências pode facultar mais informação que ajude a compreender as manifestações da infeção.

A prevalência dos diferentes serotipos na ilha de S. Miguel é também desconhecida. O teste ELISA utilizado neste trabalho apenas permite saber se os animais contactaram com os agentes, pelo que não é possível estabelecer uma relação direta com a infeção no momento da colheita de sangue.

4.5. Conclusão

A realização deste trabalho permitiu observar que os agentes virais da DRB estão amplamente distribuídos pelas explorações de bovinos leiteiros da região de São Miguel, pelo que constitui uma área de trabalho no sentido de melhorar a eficiência produtiva dos animais, o bem-estar animal e reduzir as taxas de refugo das explorações.

As seroprevalências para BVDV e BoHV-1 nas 13 explorações incluídas revelam dados bastante interessantes na medida em que existem diferenças significativas entre as explorações e dentro de cada exploração, nos grupos etários. A seroprevalência em novilhas para o BoHV-1 é significativamente baixa (5%), pelo que para o BVDV e nos restantes lotes as seroprevalências são consideravelmente superiores. Foi possível estabelecer a relação entre as seroprevalências dos grupos de animais serologicamente avaliados com as afeções mais frequentes das explorações, pelo que é notório o efeito que o BVDV e o BoHV-1 exercem sobre a infeção respiratória, retenção de membranas fetais, metrite, presença de animais *repeat breeders* e morte embrionária e aborto.

O acompanhamento reprodutivo das explorações permite detetar as manifestações reprodutivas associadas à prevalência do vírus da IBR e BVD de forma eficaz e instituir as medidas necessárias ao controlo dos agentes, pelo aconselhamento dos produtores e consequente diminuição do impacto económico associado.

Com a execução do plano de controlo e erradicação do BVDV promovido pelo governo dos Açores, é expectável uma maior deteção de animais PI e conseqüentemente uma redução da incidência e prevalência da infeção por este agente. O aconselhamento médico-veterinário permite promover a associação dos planos de controlo e erradicação à vacinação dos efetivos, juntamente com a tomada de medidas de biossegurança direcionadas à circulação de animais dentro e fora das explorações.

Os agentes BRSV e Pi-3 manifestam-se maioritariamente pela DRB. As estratégias de controlo e prevenção das infeções nos vitelos constituem o método mais eficaz para reduzir o número de casos clínicos.

5. Considerações finais

O paradigma da medicina veterinária alterou-se nas últimas décadas. Observa-se a nível mundial que os maiores avanços na saúde dos bovinos focam-se cada vez mais na prevenção de doenças e controlo dos fatores de risco do que no tratamento, sendo que a epidemiologia, imunologia, bem-estar animal e a saúde pública constituem os pilares deste notório avanço (LeBlanc *et al.*, 2006).

A realização do estágio curricular permitiu consolidar conhecimentos e adquirir competências para o exercício da clínica e cirurgia de bovinos. A disponibilidade da equipa de médicos veterinários da AJAM-CJA em ensinar e incumbir os estagiários de realizar a maioria dos procedimentos, sob supervisão, permitiu o desenvolvimento da autonomia e sentido de responsabilidade pelo ato médico-veterinário.

A possibilidade de acompanhar o serviço de assistência reprodutiva foi bastante proveitosa, na medida em que a prática dos procedimentos realizados nas visitas às explorações é fundamental para um correto diagnóstico e otimização dos resultados que se pretende atingir com o usufruto dos serviços de reprodução animal.

Ainda que a clínica de bovinos na região dos Açores seja muito diversificada e constitua a maioria dos serviços prestados aos produtores, o controlo e prevenção de doenças representa uma área crescente no setor, como se verifica pela pertinência e interesse dos produtores na participação no trabalho experimental realizado.

Referências bibliográficas

Ackermann, M. R., Derscheid, R., & Roth, J. A. (2010). Innate immunology of bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), 215-228.

AJAM-CJA (Associação dos Jovens Agricultores Micaelenses – Cooperativa Juventude Agrícola). Acedido a 15 de Maio de 2018 <http://www.ajamcja.com/>

Anderson, M. L. (2007). Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. *Theriogenology*, 68(3), 474-486.

Angelos, J. A. (2015). Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 31(1), 61-79.

Afroz, S., Brownlie, R., & Fodje, M. (2016). VP8, the Major Tegument Protein of Bovine Herpesvirus 1, Interacts with Cellular STAT1 and Inhibits Interferon Beta Signaling. *Journal of virology*, 90(10), 4889-4904.

Armengol, R., & Fraile, L. (2015). Comparison of two treatment strategies for cows with metritis in high-risk lactating dairy cows. *Theriogenology*, 83(8), 1344-1351.

Bange, U., Knoop, E. V., & Gabert, J. (2012). Improving the sensitivity of the IBR-gE ELISA for testing IBR marker vaccinated cows from bulk milk. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 125(7/8), 220-226.

Barros, S. C., Ramos, F., Paupério, S., Thompson, G., & Fevereiro, M. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus research*, 118(1-2), 192-195.

Beer, M. (2012). Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Chapter*, 2(13), 1-17. Obtido a 22 de Maio de 2018, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.12_IBR_IPV.pdf

Benevides, S. E., Flor, L. M., Martins, H. C., Sellal, E., Daly, S., & Colin, S. (2015). Phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from Azores Análise filogenética de isolados do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) dos Açores. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 110 (595-596) 182-187.

Biswas, S., Bandyopadhyay, S., Dimri, U., & H. Patra, P. (2013). Bovine herpesvirus-1 (BHV-1)– a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Veterinary Quarterly*, 33(2), 68-81.

Bolin, S. R., & Grooms, D. L. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(1), 51-68.

Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The veterinary journal*, 164(2), 116-128.

Breen, J. (2017). The importance of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in mastitis therapeutics. *Livestock*, 22(4), 182-185.

Brock, K. V. (2003). The persistence of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, 31(2), 133-135.

Brodersen, B. W. (2010). Bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), 323-333.

Brodersen, B. W. (2014). Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology*, 51(2), 453-464.

Buczinski, S., Forté, G., Francoz, D., & Bélanger, A. M. (2014). Comparison of thoracic auscultation, clinical score, and ultrasonography as indicators of bovine respiratory disease in preweaned dairy calves. *Journal of veterinary internal medicine*, 28(1), 234-242.

Calcutt, M. J., Lysnyansky, I., Sachse, K., Fox, L. K., Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2018). Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: An aid to identify future development requirements. *Transboundary and emerging diseases*.

Caldow, G. (2009). Clinical Forum-BVDV control and eradication Part 1: The biology of the disease and diagnosis. *UK Vet Livestock*, 14(3), 19-27.

Caldow, G., Geraghty, T., Mason, C., Carty, H., & Wilson, D. (2018). Bovine herpesvirus 1 infection in cattle: a discussion on vaccination and control. *Livestock*, 23(3), 110-115.

Chase, C. C., Thakur, N., Darweesh, M. F., Morarie-Kane, S. E., & Rajput, M. K. (2015). Immune response to bovine viral diarrhea virus—looking at newly defined targets. *Animal health research reviews*, 16(1), 4-14.

Chase, C. C., Fulton, R. W., O'Toole, D., Gillette, B., Daly, R. F., Perry, G., & Clement, T. (2017). Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Veterinary microbiology*, 206, 69-77.

Corbeil, L. B. (2015). Histophilus somni Surface Proteins. In *Histophilus somni* (pp. 89-107). Springer, Cham.

Cutler, K. (2018). Thoughts on the diagnosis and control of Johne's disease in cattle. *Livestock*, 23(2), 68-70.

Dabo, S. M., Taylor, J. D., & Confer, A. W. (2007). Pasteurella multocida and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), 129-150.

DeGaris, P. J., & Lean, I. J. (2008). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Journal*, 176(1), 58-69.

Diretiva 2003/43/CEE, de 26 de Maio. *Que altera a Directiva 88/407/CEE que fixa as exigências de polícia sanitária aplicáveis às trocas comerciais intracomunitárias e às importações de sémen de animais da espécie bovina*. Jornal Oficial nº L268/92. Conselho das Comunidades Europeias. Bruxelas. Obtido a 28 de Maio de 2018, de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003L0043>

Duarte, C. M., Freitas, P. P., & Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 665-672.

Dubovi, E. J. (2013). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41(1), 8-13.

Earley, B., Sporer, K. B., & Gupta, S. (2017). Invited review: Relationship between cattle transport, immunity and respiratory disease. *animal*, 11(3), 486-492.

Edwards, T. A. (2010). Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Veterinary clinics: Food animal practice*, 26(2), 273-284.

Ellis, J. A. (2009). Update on viral pathogenesis in BRD. *Animal health research reviews*, 10(2), 149-153.

Ellis, J. A. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(3), 575-593.

Ellis, J. A. (2017). How efficacious are vaccines against bovine respiratory syncytial virus in cattle?. *Veterinary microbiology*, 206, 59-68.

Fecteau, M. E. (2018). Paratuberculosis in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(1), 209-222.

Fenner, F. J., Bachmann, P. A., & Gibbs, E. P. J. (2010a). Herpesvirales. In *Fenner's Veterinary virology* 4th edition Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., Academic Press, UK, Oxford, ISBN: 978-0-12-375158-4. pp 184-186;

Fenner, F. J., Bachmann, P. A., & Gibbs, E. P. J. (2010b). Paramyxoviridae. In *Fenner's Veterinary virology* 4th edition Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., Academic Press, UK, Oxford, ISBN: 978-0-12-375158-4. pp 323-324.

Fourichon, C., Beaudeau, F., Bareille, N., & Seegers, H. (2005). Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Preventive veterinary medicine*, 72(1-2), 177-181.

Fricke, P. M., Ricci, A., Giordano, J. O., & Carvalho, P. D. (2016). Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 32(1), 165-180.

Fulton, R. W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983–2009). *Animal Health Research Reviews*, 10(2), 131-139.

Gammon, D. (2014). Milk fever prevention: a clinical review of current prevention strategies. *Livestock*, 19(3), 142-146.

Gates, M. C., Humphry, R. W., Gunn, G. J., & Woolhouse, M. E. (2014). Not all cows are epidemiologically equal: quantifying the risks of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) transmission through cattle movements. *Veterinary research*, 45(1), 110.

Geraghty, T., O'Neill, R., More, S. J., & O'Grady, L. (2012). Dynamics of individual animal Bovine Herpes Virus-1 antibody status on 9 commercial dairy herds. *Research in veterinary science*, 93(1), 143-149.

Gershwin, L. J. (2012). Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(3), 253-257.

Gil da Costa, R. M., Peleteiro, M. C., Pires, M. A., & DiMaio, D. (2017). An update on canine, feline and bovine papillomaviruses. *Transboundary and emerging diseases*, 64(5), 1371-1379.

Gilbert, R. O. (2016). Management of reproductive disease in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 32(2), 387-410.

Giuliodori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. A., & de la Sota, R. L. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of dairy science*, 96(6), 3621-3631.

Givens, M. D., & Marley, M. S. (2013). Immunology of chronic BVDV infections. *Biologicals*, 41(1), 26-30.

Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1), 50-57.

Golder, H. M., Moss, N., Rogers, G., Jackson, B., Gannon, N., Wong, P. T. W., & Lean, I. J. (2017). Acute photosensitisation and mortality in a herd of dairy cattle in Tasmania. *New Zealand veterinary journal*, 65(1), 39-45.

Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*, 72(4), 377-382.

Gorden, P. J., & Plummer, P. (2010). Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), 243-259.

Governo dos Açores:

<http://www.azores.gov.pt/Portal/pt/entidades/sraf-drdtr/textoTabela/Programa+Global+SAA.htm>
acedido a 25 de Maio de 2018.

Graham, D. A. (2013). Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle—a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. *Irish veterinary journal*, 66(1), 15.

Gray, D. W., Welsh, M. D., Doherty, S., & Mooney, M. H. (2017). Identification of candidate protein markers of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 infection using an in vitro model. *Veterinary microbiology*, 203, 257-266.

Griffin, D., Chengappa, M. M., Kuszak, J., & McVey, D. S. (2010). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), 381-394.

Grooms, D. L., Baker, J. C., & Ames, T. R., (2009) Diseases caused by Bovine Virus Diarrhoea Virus. In *Large Animal Internal Medicine*, 4th edition. Smith, B. P. Mosby Elsevier, USA, ISBN: 9780323042970, pp 858-865.

Guterbock, W. M. (2014). The impact of BRD: the current dairy experience. *Animal health research reviews*, 15(2), 130-134.

Guzman, E., & Taylor, G. (2015). Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves. *Molecular immunology*, 66(1), 48-56.

Hägglund, S., & Valarcher, J. F. (2016). 48 Bovine Respiratory Syncytial Virus. In *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*, 413.

Haimerl, P., & Heuwieser, W. (2014). Invited review: Antibiotic treatment of metritis in dairy cows: a systematic approach. *Journal of dairy science*, 97(11), 6649-6661.

Hartnack, A. K. (2017). Spinal Cord and Peripheral Nerve Abnormalities of the Ruminant. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 33(1), 101-110.

Hilton, L., Moganeradj, K., Zhang, G., Chen, Y. H., Randall, R. E., McCauley, J. W., & Goodbourn, S. (2006). The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *Journal of virology*, 80(23), 11723-11732.

Hilton, W. M. (2014). BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go?. *Animal health research reviews*, 15(2), 120-122.

Holman, D. B., McAllister, T. A., Topp, E., Wright, A. D. G., & Alexander, T. W. (2015). The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Veterinary microbiology*, 180(1-2), 90-95.

Ibrahim, H. M. M., El-seedy, Y. Y., & Gomaa, N. A. (2016). Cytokine response and oxidative stress status in dairy cows with acute clinical mastitis. *J Dairy Vet Anim Res*, 3(1), 00064.

INE – Instituto Nacional de Estatística
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000537&contexto=bd&selTab=tab2 acedido a 21/05/2018.

Jamali, H., Barkema, H. W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E. M., Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H. & Dufour, S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of dairy science*.

Jones, C. (2013). Bovine herpes virus 1 (BHV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) promote survival of latently infected sensory neurons, in part by inhibiting apoptosis. *Journal of cell death*, 6, JCD-S10803.

Jones, C. (2016). Latency of Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) in Sensory Neurons. In *Herpesviridae*. InTech.

Jones, C., & Chowdhury, S. (2010). Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), 303-321.

Kaur, G., & Chandra, M. (2016). Herpesvirus in Bovines: Importance of Bovine Herpesvirus Type 1. In *Herpesviridae*. InTech.

Kelling, C. L., & Topliff, C. L. (2013). Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. *Biologicals*, 41(1), 20-25.

Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. (2017). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*

Klemens, O., Dubrau, D., & Tautz, N. (2015). Characterization of the determinants of NS2-3-independent virion morphogenesis of pestiviruses. *Journal of virology*, 89(22), 11668-11680.

Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal*, 199(2), 201-209.

Laureyns, J., Ribbens, S., & de Kruif, A. (2010). Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. *The Veterinary Journal*, 184(1), 21-26.

Laven, R. (2008). Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-associated problems. *UK Vet Livestock*, 13(3), 37-41.

LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Duffield, T. F., & Leslie, K. E. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 89(4), 1267-1279.

Levings, R. L., & Roth, J. A. (2013a). Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. *Animal health research reviews*, 14(1), 88-102.

Levings, R. L., & Roth, J. A. (2013b). Immunity to bovine herpesvirus 1: II. Adaptive immunity and vaccinology. *Animal health research reviews*, 14(1), 103-123.

Lindberg, A., & Houe, H. (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive veterinary medicine*, 72(1-2), 55-73.

Lindberg, A., Brownlie, J., Gunn, G., Houe, H., Moening, V., Saatkamp, H. W., Sandvik, T., & Valle, P. S. (2006). The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. In *Plurithematic issue of the Scientific and technical review, 2006*(Vol. 25, pp. 961-979).

Luzzago, C., Bronzo, V., Salvetti, S., Frigerio, M., & Ferrari, N. (2010). Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Veterinary research communications*, 34(1), 19-24.

Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2010). *Fenner's veterinary virology* 4th edition. Academic press, UK, Oxford, ISBN: 978-0-12-375158-4, pp 477-479.

Mahendran, S. A. (2018). FeverTags: engaging technology in the battle against bovine respiratory disease. *Livestock*, 23(3), 118-121.

Mätzener, P., Magkouras, I., Rümenapf, T., Peterhans, E., & Schweizer, M. (2009). The viral RNase Erns prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus research*, 140(1-2), 15-23.

Maxwell, H. (2007). Bovine pregnancy diagnosis. *Comparative Reproductive Biology*, 325-329.

McGuirk, S. M. (2008). Disease management of dairy calves and heifers. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 24(1), 139-153.

McGuirk, S. M., & Peek, S. F. (2014). Timely diagnosis of dairy calf respiratory disease using a standardized scoring system. *Animal health research reviews*, 15(2), 145-147.

Moeller Jr, R. B., Adaska, J., Reynolds, J., & Blanchard, P. C. (2013). Systemic bovine herpesvirus 1 infections in neonatal dairy calves. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 25(1), 136-141.

- Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*, 7(1), 29.
- Mosier, D. (2015). Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Animal health research reviews*, 15(2), 166-168.
- Muratore, E., Bertolotti, L., Nogarol, C., Caruso, C., Lucchese, L., Iotti, B., Ariello, D., Moresco, A., Masoero, L., Nardelli, S., & Rosati, S. (2017). Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis in marker-vaccinated dairy herds: Application of a recombinant gE ELISA on bulk milk samples. *Veterinary immunology and immunopathology*, 185, 1-6.
- Murray, G. M., More, S. J., Sammin, D., Casey, M. J., McElroy, M. C., O'Neill, R. G., Burne, W. J., Earley, B., Clegg, T. A., Ball, H., Cassidy, J. P., & Bell, C. J. (2017). Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(1), 20-34.
- Muykens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., & Thiry, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary research*, 38(2), 181-209.
- Neill, J. D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41(1), 2-7.
- Neill, J. D., Ridpath, J. F., & Valayudhan, B. T. (2015). Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. *BMC veterinary Research*, 11(1), 112.
- Nettleton, P., & Russell, G. (2017). Update on infectious bovine rhinotracheitis. *In Practice*, 39(6), 255-272.
- Newcomer, B. W., & Givens, D. (2016). Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance: Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhoea. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 32(2), 425-441.
- Newcomer, B. W., Chamorro, M. F., & Walz, P. H. (2017). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary microbiology*, 206, 78-83.
- Niskanen, R., & Lindberg, A. (2003). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal*, 165(2), 125-130.

Oetzel, G. R. (2012). An update on hypocalcemia on dairy farms. In *Proceedings of the Four-State Dairy Nutrition and Management Conference*. pp. 80-85.

Pedreira, M., Gómez-Villamandos, J. C., Risalde, M. A., Molina, V., & Sánchez-Cordón, P. J. (2012). Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1. *Journal of comparative pathology*, 146(1), 30-39.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., & Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary research*, 41(6), 44.

Peterhans, E., & Schweizer, M. (2013). BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, 41(1), 39-51.

Pinto, C., Santos, V. M., Dinis, J., Peleteiro, M. C., Fitzgerald, J. M., Hawkes, A. D., & Smith, B. L. (2005). Pithomycotoxicosis (facial eczema) in ruminants in the Azores, Portugal. *The Veterinary Record*, 157(25), 805.

Pohler, K. G., Franco, G. A., Reese, S. T., Dantas, F. G., Ellis, M. D., & Payton, R. R. (2016). Past, present and future of pregnancy detection methods. *Appl Reprod Strategies Beef Cattle*, 251-259.

Portaria nº 56/2016 de 21 de Junho. Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores nº 75/2016 – I Série. Secretaria Regional da Agricultura e Ambiente. Governo dos Açores. Ponta Delgada. Obtido a 28 de Maio de 2018, de <http://www.azores.gov.pt/JO/Serie+I/2016/S%C3%A9rie+I+N%C2%BA+75+de+21+de+Junho+de+2016/Portaria+N%C2%BA+56+de+2016.htm>

Portaria nº 29/2018 de 27 de Março. Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores nº 40/2018 – I Série. Secretaria Regional da Agricultura e Florestas. Governo dos Açores. Ponta Delgada. Obtido a 28 de Maio de 2018, de <https://jo.azores.gov.pt/#/ato/88e6a5ee-1ba0-41ec-a7cd-d31abf0d585d>

Potter, T. (2015). Bovine respiratory disease. *Livestock*, 20(1), 14-18.

Potter, T., Barrett, D., Cutler, K., Hart, K., & Biggs, A. (2017). Clinical forum: bovine respiratory disease. *Livestock*, 22(1), 6-11.

- Poulton, P. J., Vizard, A. L., Anderson, G. A., & Pyman, M. F. (2016). High-quality care improves outcome in recumbent dairy cattle. *Australian veterinary journal*, 94(6), 173-180.
- Pritchard, G. C., Banks, M., & Vernon, R. E. (2003). Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus infection in dairy herd of high health status. *The Veterinary Record*, 153(4), 113-117.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). Diseases of the Alimentary Tract II. In *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 10th edition. Saunders Elsevier, EUA, ISBN – 13: 978-0702027772 pp 371-381.
- Raaperi, K., Nurmoja, I., Orro, T., & Viltrop, A. (2010). Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. *Preventive veterinary medicine*, 96(1-2), 74-81.
- Raaperi, K., Orro, T., & Viltrop, A. (2014). Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *The Veterinary Journal*, 201(3), 249-256.
- Raboisson, D., Trillat, P., & Cahuzac, C. (2016). Failure of passive immune transfer in calves: A meta-analysis on the consequences and assessment of the economic impact. *PloS one*, 11(3), e0150452.
- Reppert, E. J. (2015). Evidence for the use of ceftiofur for treatment of metritis in dairy cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 31(1), 139-149.
- Ridpath, J. F. (2010). Bovine viral diarrhea virus: global status. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(1), 105-121.
- Roberson, J. R. (2012). Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 28(2), 271-288.
- Robinson, K. E., Meers, J., Gravel, J. L., McCarthy, F. M., & Mahony, T. J. (2008). The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. *Journal of General Virology*, 89(11), 2851-2863.
- Rodrigues, I. (2014). A review on the effects of mycotoxins in dairy ruminants. *Animal Production Science*, 54(9), 1155-1165.

Rodríguez, E. M., Bach, A., Devant, M., & Aris, A. (2016). Is calcitonin an active hormone in the onset and prevention of hypocalcemia in dairy cattle? *Journal of dairy science*, 99(4), 3023-3030.

Roland, L., Drillich, M., Klein-Jöbstl, D., & Iwersen, M. (2016). Invited review: Influence of climatic conditions on the development, performance, and health of calves. *Journal of dairy science*, 99(4), 2438-2452.

Sacco, R. E., McGill, J. L., Pillatzki, A. E., Palmer, M. V., & Ackermann, M. R. (2014). Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Veterinary pathology*, 51(2), 427-436.

Sayers, R. G. (2017). Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *Journal of dairy science*, 100(2), 1340-1352.

Schnee, C., Heller, M., Schubert, E., & Sachse, K. (2015). Point prevalence of infection with *Mycoplasma bovoculi* and *Moraxella* spp. in cattle at different stages of infectious bovine keratoconjunctivitis. *The Veterinary Journal*, 203(1), 92-96.

Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Sipka, A., Smith, D. G. E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N. & Seyfert, H.-M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3-4), 270-289.

Sheldon, I. M., & Owens, S. E. (2017). Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *ANIMAL REPRODUCTION*, 14(3), 622-629.

Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M., & Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176(1), 115-121.

Smith, B. P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*, 4th edition. Mosby Elsevier, EUA, ISBN: 9780323042970. pp 858-865.

Statham, J. M., Randall, L. V., & Archer, S. C. (2015). Reduction in daily milk yield associated with sub-clinical bovine herpes virus 1 infection. *Veterinary Record*, 177(13), 339.

Stilwell, G. (2013). *Clínica de Bovinos*, 1^a edição, Publicações Ciência&Vida, Lisboa, ISBN: 978-972-590-092-8, pp 120-121; 135-137; 163-164.

Suojala, L., Kaartinen, L., & Pyörälä, S. (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis—an evidence-based approach. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 36(6), 521-531.

Takimoto, T., & Portner, A. (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus research*, 106(2), 133-145.

Tautz, N., Tews, B. A., & Meyers, G. (2015). The molecular biology of pestiviruses. In *Advances in virus research* (Vol. 93, pp. 47-160). Academic Press.

Taylor, J. D., Fulton, R. W., Lehenbauer, T. W., Step, D. L., & Confer, A. W. (2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal*, 51(10), 1095.

Tignon, M., De Baere, M., Hanon, J. B., Goolaerts, A., Houtain, J. Y., Delooz, L., & Cay, A. B. (2017). Characterization of three commercial ELISA kits for detection of BOHV-1 gE specific antibodies in serum and milk samples and applicability of bulk milk for determination of herd status. *Journal of virological methods*, 245, 66-72.

Thulke, H. H., Lange, M., Tratalos, J. A., Clegg, T. A., McGrath, G., O'Grady, L., O'Sullivan, P., Doherty, M. L., Graham, D. A., & More, S. J. (2017). Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. *Preventive veterinary medicine*.

Tsujita, H., & Plummer, C. E. (2010). Bovine ocular squamous cell carcinoma. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(3), 511-529.

Unnerstad, H. E., Lindberg, A., Waller, K. P., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., & Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary microbiology*, 137(1-2), 90-97.

Valarcher, J. F., & Taylor, G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary research*, 38(2), 153-180.

Van der Fels-Klerx, H. J., Sørensen, J. T., Jalvingh, A. W., & Huirne, R. B. M. (2001). An economic model to calculate farm-specific losses due to bovine respiratory disease in dairy heifers. *Preventive veterinary medicine*, 51(1-2), 75-94.

Van Metre, D. C., Tennant, B. C., & Whitlock, R. B., (2008). Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2nd Ed. Divers, T. J., & Peek, S. F., Elsevier, EUA, ISBN-13:978-1-4160-3137-6, pp 258-273.

Veljović, L., Knežević, A., Milić, N., Krnjaić, D., Miković, R., Zorić, A., Marcović, M., Milićević, V., Stamenković, M., Stanojević, M., Petrović, T., Nisavić, J., & Maksimović-Zorić, J. (2016). Isolation and Molecular Detection of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Cattle in Serbia. *Acta Veterinaria*, 66(4), 509-519.

Weber, M. N., Mósen, A. C. S., Simões, S. V. D., Almeida, L. L., Pessoa, C. R. M., Budaszewski, R. F., Silva, T. R., Ridpath, J. F., Riet-Correa, F., Driemeier, D., & Canal, C. W. (2016). Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with 'HoBi'-like Pestivirus in a Field Outbreak. *Transboundary and emerging diseases*, 63(1), 92-100.

Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The veterinary journal*, 192(2), 148-152.

Williams, P. (2008). Assessing the true cost of BRD in cattle. *UK Vet Livestock*, 13(6), 51-53.

Winkler, M. T. C., Doster, A., Sur, J. H., & Jones, C. (2002). Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Veterinary microbiology*, 86(1-2), 139-155.

Woodbine, K. A., Medley, G. F., Moore, S. J., Ramirez-Villaescusa, A. M., Mason, S., & Green, L. E. (2009). A four-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. *BMC Veterinary Research*, 5(1), 5.

Anexo I: Inquérito Epidemiológico

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO – Caracterização da infeção por BVDV e BoHV-1 em explorações leiteiras da ilha de São Miguel, Açores

Nome do produtor: _____

Coordenadas exploração: _____

1. Caracterização da exploração

Freguesia: _____

Concelho: _____

Número total de animais: _____

Número de animais em lactação: _____

Existem explorações contíguas? Sim Não

Regime de exploração:

Ventilação da vacaria:

Intensivo

Boa

Semi-Intensivo

Razoável

Extensivo

Má

Frequência da limpeza dos estábulos/vacaria/parques de alimentação:

Diária

Dias alternados

Semanal

Variável

Sistema de ordenha?

Fixa

Móvel

2. Recria e manejo dos animais de substituição

Faz recria de vitelos? Sim Não

Administra colostro aos vitelos? Sim Não

Condições da recria de vitelos:

Ventilação das instalações de recria:

Estabulação individual

Boa

Estabulação em grupo

Razoável

Pastagem

Má

Recria das novilhas de substituição:

Novilhas estão com as vacas secas?

Estabulação

Sim

Pastagem

Não

Tem o hábito de adquirir animais para a sua exploração? (novilhas de substituição, vacas adultas)

Sim

Não

3. Reprodução

Maneio reprodutivo das vacas:

- Cobrição natural
- Inseminação artificial após detecção de cio
- Inseminação artificial e cobrição natural

Faz o acompanhamento reprodutivo do seu efetivo junto de um médico veterinário?

- Sim
- Não

4. Doenças presentes na exploração

Patologias reprodutivas frequentes na exploração: (considerar frequente a partir dos 5% do efetivo em lactação)

- Retenção das Membranas Fetais
- Metrites
- Vacas *repeat breeders*
- Mortes embrionárias e aborto

Outras patologias frequentes na exploração: (considerar frequente a partir dos 5%)

- Pneumonia nos animais jovens
- Pneumonia nos animais adultos
- Diarreia nos animais jovens
- Diarreia nos animais adultos

Doenças infecciosas presentes na exploração: (resultado serológico positivo)

- Neosporose
- Paratuberculose
- Febre Q
- Clamidiose

Obrigado pela colaboração,

Bruno Costa

Notas:

Regime intensivo: explorações em que os animais estão confinados, sem pastoreio. Alimentação exclusiva na manjedoura.

Regime semi-intensivo: explorações que fazem recurso a espaços fechados para os animais pernoitarem, abrigarem-se de condições meteorológicas adversas. Parte da alimentação é feita à manjedoura. Há acesso ao exterior e pastoreio durante o dia e/ou noite.

Regime extensivo: explorações que funcionam única e exclusivamente no exterior, em que os animais estão permanentemente na pastagem. Pode existir alimentação com feno e silagem, em zonas ao ar livre.